

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Diplomová práce

**Testování nanovláken jako potenciálních sorbentů
pro extrakci tuhou fází
s využitím sekvenční injekční analýzy**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Veronika Jirsíková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne 15.5.2018

.....
Veronika Jirsíková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Ivaně Horstkotte Šrámkové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, zkušenosti a čas, který věnovala při vzniku této práce, Lauře Carbonell Rozas za spolupráci při měření a ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za přínosné postřehy a konzultantce doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. Zvláštní poděkování věnuji své rodině, která mi byla oporou v průběhu celého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Veronika Jirsíková

Školitel: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název: Testování nanovláken jako potenciálních sorbentů pro extrakci tuhou fází s využitím sekvenční injekční analýzy

Diplomová práce se zabývá testováním různých typů nanovláken, které mohou mít využití jako sorbenty v extrakci tuhou fází v systému sekvenční injekční analýzy. Testovaná nanovláknina byla vyrobena pomocí techniky elektrostatického zvlákňování. Byla použita polyamidová (PA) a polyvinylidenfluoridová (PVDF) nanovláknina. Modelovými analyty byly zvoleny ženské pohlavní hormony, nesteroidní antiflogistika, H₂ antihistaminika, bisfenoly a klenbuterol.

Analýza byla prováděna v systému sekvenční injekční analýzy (SIA), do kterého byla zapojena polymethylmetakrylátová kolona, naplněná vždy jedním druhem testovaných nanovláken. Detekce probíhala spektrofotometrem při vlnových délkách typických pro vybrané analyty.

V rámci měření byla pozorována retence jednotlivých analytů na nanovlákniněch v závislosti na chemické struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech. Nejvíce měření proběhlo u nanovláken polyvinylidenfluoridu, kde byla pozorována vysoká retence testovaných analytů.

Nejvyšší retenci vykazovali zástupci ze skupiny ženských pohlavních hormonů, bisfenolů a nesteroidních antiflogistik. Naopak nejnižší záchyt byl zaznamenán u klenbuterolu. Další měření probíhala s diklofenakem, u kterého byla zaznamenána kompletní retence na PVDF nanovlákniněch. Cílem bylo najít univerzální metodu pro extrakci látek s různými fyzikálně – chemickými vlastnostmi na polyamidových a polyvinylidenfluoridových nanovlákniněch v systému sekvenční injekční analýzy. Testovaná nanovláknina se ukázala jako vhodný potenciální sorbent pro extrakci tuhou fází v SIA systému.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Veronika Jirsíková

Supervisor: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Consultant: Assoc. Prof. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Testing of nanofibers as potential sorbents for solid phase extraction using sequential injection analysis

This diploma thesis deals with the testing of various types of nanofibers which can be used as sorbents in solid phase extraction in a sequential injection analysis system. The tested nanofibers were made by electrospinning. The polyamide (PA) and polyvinylidene fluoride (PVDF) nanofibers were used. Female sex hormones, non-steroidal anti-inflammatory drugs, H₂ antihistamines, bisphenols and clenbuterol were chosen as model analytes.

The analysis was carried out in the sequential injection analysis (SIA) in which a polymethylmethacrylate column was integrated. The column was filled with one type of the tested nanofibers. The detection was performed by a spectrophotometer at a wavelength of absorption maximum of the selected analytes. The retention of individual analytes on the nanofibers was observed depending on the chemical structure and the physicochemical properties. The most measurements were carried out with polyvinylidene fluoride nanofibers where high retention of tested analytes was observed.

The most retained analytes were from the group of the female sex hormone, bisphenols and non-steroidal anti-inflammatory drugs. On the contrary, the lowest capture was recorded for clenbuterol. Next measurements were performed with diclofenac, where complete retention on PVDF nanofibers was recorded.

The goal was to develop a general analytical method with nanofibers for extraction of various types of substances on PA and PVDF nanofibers in a sequential injection analysis system. The tested nanofibers have been proved as a potential sorbent for solid phase extraction in the SIA system.

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod	9
2. Cíl a popis zadání práce	10
3. Teoretická část	11
3.1. Průtokové techniky – Sekvenční injekční analýza	11
3.1.1. SIA systém	11
3.1.2. Princip SIA	12
3.1.3. Další průtokové techniky	13
3.1.4. Využití SIA	13
3.2. Extrakce tuhou fází	14
3.2.1. Princip	14
3.2.2. Sorbenty	15
3.3. Nanovlákná	18
3.3.1. Charakterizace	18
3.3.2. Příprava	18
3.3.3. Složení nanovláken použitých v diplomové práci	20
3.3.4. Využití nanovláken	21
3.4. Analyzované látky	24
4. Experimentální část	29
4.1. Přístrojové vybavení a pomůcky	29
4.2. Použité chemikálie	30
4.3. Příprava roztoků a kolonky	32
4.3.1. Příprava zásobních roztoků a elučních činidel	32
4.3.2. Příprava pracovních roztoků	32
4.3.3. Příprava kolonky s nanovláknou	33
4.4. Metoda měření	34
5. Výsledky a diskuze	35
5.1. Předběžné experimenty	35
5.1.1. Optimalizace objemu vzorku	35
5.1.2. Optimalizace průtokové rychlosti dávkování vzorků	36
5.2. Polyamidová nanovlákná	37
5.2.1. Ženské pohlavní hormony	37

5.2.2.	Klenbuterol.....	39
5.2.3.	H ₂ antihistaminika	40
5.3.	Polyvinylidenfluoridová nanovláčna	41
5.3.1.	Ženské pohlavní hormony	41
5.3.2.	H ₂ antihistaminika	42
5.3.3.	Nesteroidní antiflogistika	43
5.3.4.	Klenbuterol.....	44
5.3.5.	Bisfenoly	45
5.4.	Optimalizace SPE metody pro diklofenak.....	46
6.	Shrnutí	57
7.	Závěr.....	58
8.	Literatura	59
	Seznam obrázků.....	64
	Seznam tabulek	64
	Seznam grafů	65

Seznam zkratk

A_{max}	absorbance v maximu
D	detektor
FIA	průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
LOD	mez detekovatelnosti (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantitation)
PA	polyamid
PVDF	polyvinylidenfluorid
RSD	relativní směrodatná odchylka
SIA	sekvenční injekční analýza (sequential injection analysis)
SPE	extrakce tuhou fází (solid phase extraction)
STD	směrodatná odchylka

1. Úvod

Úprava vzorku je jedna z nejdůležitějších částí před provedením analýzy vzorků s komplexní maticí. V současné době se nejčastěji používá pro předběžnou úpravu vzorku metoda extrakce tuhou fází (SPE). Mezi hlavní důvody užití této metody patří snížení počtu kroků úpravy a tím snížení vzniku chyb způsobených lidským faktorem a odstranění interferujících látek z matrice vzorku, které by mohly záporně ovlivnit stanovení cílových analytů. Velmi žádaná je automatizace celého procesu, vyšší citlivost a přesnost a nižší spotřeba vzorků a rozpouštědel. Jednotlivé sorbenty se kromě struktury nosičů a aktivních míst liší různou afinitou k různým typům analytů. Cílem nových trendů jsou nové typy materiálů sorbentů, které jsou chemicky, strukturně i fyzikálně stabilnější.

Nanovláknenné materiály mají výhodu v tom, že mají velký poměr plochy k povrchu a tím i vysokou sorpční kapacitu, tudíž se jeví jako sorbenty s velkým potenciálem pro SPE. Nejčastěji se nanovláknena vyrábí pomocí elektrostatického zvláknování, které vytváří nanovláknena pomocí elektricky nabitého pole z polymerního roztoku nebo taveniny.

V této práci bylo testováno, zda se nanovláknena dají zapojit do průtokového systému a jestli je lze v tomto systému použít jako sorbenty pro extrakci tuhou fází.

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem práce bylo otestovat možnost použití různých typů nanovláken jako sorbentů pro extrakci tuhou fází za použití průtokového systému.

Dílčí cíle byly následující:

- Ověřit možnost zapojení nanovláken do průtokového systému ve vhodném zařízení.
- Zjistit, jestli je možné použít nanovlákná jako sorbenty pro extrakci tuhou fází v sekvenční injekční analýze.
- Vyvinout a optimalizovat skrínigovou metodu pro měření modelových analytů s různými chemickými vlastnostmi a strukturou ze skupin nesteroidních antiflogistik, ženských pohlavních hormonů, H₂ antihistaminik, β_2 sympatomimetik a bisfenolů.
- Ověřit retenci modelových analytů na jednotlivých typech nanovláken a porovnat je.
- Optimalizovat extrakční metodu pro nesteroidní antiflogistika.

3. Teoretická část

3.1. Průtokové techniky – Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (SIA) patří mezi průtokové analytické metody, jejichž princip je založen na měření signálu analytu v toku nosného proudu. K výhodám těchto technik patří malý objem vzorku potřebný k analýze, z toho vyplývající snížení odpadu z provedeného měření a vyšší rychlost měření v porovnání s manuálním provedením.

SIA byla vyvinuta při zdokonalování průtokové injekční analýzy (FIA) [1]. Obě metody patří mezi nízkotlaké neseparační techniky, které jsou kinetické, nestacionární a liší se v několika bodech [2]. V SIA systému bylo nahrazeno peristaltické čerpadlo pístovou pumpou. Díky tomu byl umožněn obousměrný tok, který lépe promísí aspirované zóny. Snížilo se také pulzování toku nosného proudu. Injekční ventil byl v SIA nahrazen vícecestným selekčním ventilem, který aspiruje do průtokového systému přesný objem různých roztoků [2].

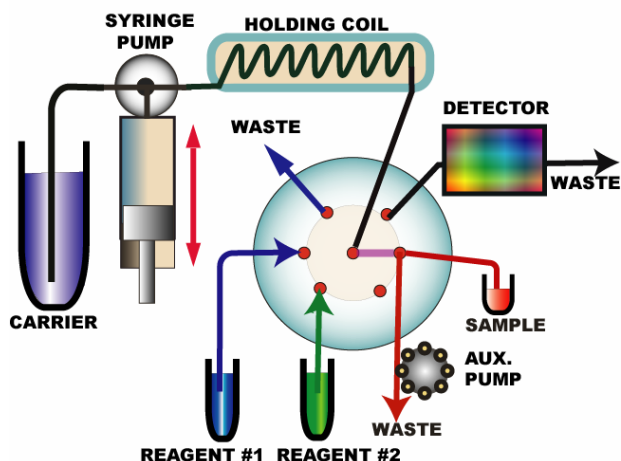
3.1.1. SIA systém

Součástí SIA systému (obrázek 1) je počítač s příslušným ovládacím programem, který řídí celou analýzu a zároveň zpracovává, uchovává a vyhodnocuje výstupní data. Další částí je jednobáňové dvousměrné čerpadlo, které aspiruje činidla a vzorky do mísící cívky, která zabraňuje vstupu vzorku a činidel do čerpadla. Slouží k promíchání jednotlivých zón (vzorku a jednotlivých činidel). Většinou se nachází mezi čerpadlem a vícecestným selekčním ventilem, její umístění nemusí být stálé. Další cívka se může nacházet před detektorem. Toto umístění se nepoužívá u rychle probíhajících reakcí.

Vícecestný selekční ventil je synchronizován s pohybem čerpadla a je řízen počítačem. Ventil je nejčastěji 6-, 8- a 10-cestný. Přepínáním portů ventilu se řídí pořadí aspirace jednotlivých zón v mísící cívce, aspirace všech roztoků a transport zón do detektoru.

Volba detektoru v SIA systému záleží na druhu použité analytické reakce. Používají se zejména spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické s náležitými průtokovými celami. Jako spojovací díly se využívají většinou teflonové hadičky.

V SIA se jednoduše mění parametry analýzy pomocí ovládacího programu, aniž by se měnilo sestavení přístroje. Pro složitější analýzy, např. pro dialýzu a difuzi plynů přes membránu, se systém doplňuje dalšími částmi, které jsou důležité pro danou analýzu [1].



Obrázek 1: Schéma sekvenční injekční analýzy (SIA) [3]
 Carrier – nosný proud, syringe pump – čerpadlo, holding coil – mísící cívka,
 detector – detektor, sample – vzorek, aux. pump – pomocné čerpadlo, waste – odpad, reagent –
 činidlo.

3.1.2. Princip SIA

Principem SIA jsou oddělené měřicí cykly a změny přímého a zpětného toku. Do mísící cívky je aspirován přesný objem vzorku, poté je aspirováno činidlo. Tyto zóny se pohybují a následně jsou vzájemně smíseny a nastane chemická reakce. Po obrácení směru toku zóny dále reagují a signál vzniklého produktu je měřen v detektoru, který je propojen s počítačem. Intenzita signálu reakčního produktu v detektoru je charakterizována píky, jejichž výška je úměrná koncentraci analytu [4, 5].

SIA pracuje v řadě sousledných naprogramovaných dějů (pohyb pístu čerpadla), které jsou synchronizované s přepínáním pozic vícecestného selekčního ventilu. Tento děj je nezbytný k docílení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému.

V jednotlivých cyklech je cíleně měněn objem vzorku nastavením doby otevření daného kanálu selekčního ventilu. Může tím být zlepšena disperze zóny vzorku podle koncentrace analytu, a když je propojen jeden z kanálů selekčního ventilu s roztokem standardu, je provedena on-line kalibrace [1].

3.1.3. Další průtokové techniky

Mezi další průtokové (neseparační) techniky jsou řazeny kontinuální průtoková analýza (CFA), jejímž principem je kontinuální dávkování nosného proudu a vzorku do průtokového systému. Její nevýhodou však je vysoká spotřeba roztoků, které se dávkují v průběhu analýzy. Segmentovaná průtoková analýza (SFA) dávkuje jednotlivé vzorky do systému tak, že jsou odděleny vzduchovou bublinkou. Díky tomu se systém nemusí mezi dílčími vzorky promývat. I v tomto případě je nevýhodou vysoká spotřeba roztoků. Průtoková injekční analýza (FIA) do průtokového systému kontinuálně čerpá nosný proud a reakční činidla. Malé objemy vzorků jsou dávkované do nosného proudu.

K novějším průtokovým systémům patří právě sekvenční injekční analýza, sekvenční injekční analýza v „Lab-on-valve“ uspořádání a sekvenční injekční chromatografie (SIC), založená na zařazení separační kolony do systému. Další průtoková technika „Lab-In-Syringe“ je založena na aspiraci všech roztoků do prostoru pístové pumpy. Dochází tak k homogennímu promíchání na rozdíl od výše zmíněných technik, u kterých se k mísení využívá řízené disperze [6].

3.1.4. Využití SIA

SIA technika má mnoho aplikací. Využívá se v zemědělství při analýze půdy, hnojiv a rostlin, kdy je třeba v jedné sezóně zanalyzovat až tisíce vzorků. Včasná detekce možných problémů může zabránit budoucím časovým a finančním ztrátám. Při sledování kvality životního prostředí jsou žádoucí velmi nízké detekční limity. S různými úpravami přístroje lze analyzovat širokou škálu živin a toxinů. Zařízení OmniSIA je vhodné pro testování biosenzorů. Ve výzkumu, farmacii a v průmyslovém zpracování umožňuje on-line sledování jakéhokoliv procesu. SIA technika má automatizované základní postupy jako je ředění, extrakce tuhými fázemi, zahřívání, difuze plynů a dialýzu. Tyto základní činnosti slouží k předběžnému zpracování vzorků pro měření na jakémkoliv analytickém zařízení např. na spektrofotometru, amperometrickém detektoru, kapalinovém chromatografu nebo jiných [7-10].

3.2. Extrakce tuhou fází

3.2.1. Princip

Principem extrakce tuhou fází (solid phase extraction, SPE) je, že se analyt na základě adsorpce nebo jiné interakce extrahuje ze vzorku (kapalná fáze) a koncentruje se v tuhé fázi. Z ní je pak odstraněn elucí vhodně vybraným rozpouštědlem (např. methanolem) a dále analyzován [11-13].

Obecným postupem SPE je nejprve kondicionace, kterou se kolonka připraví propláchnutím rozpouštědlem. Tím se mohou vymýt případné nečistoty a sorbent je připraven na interakci jednotlivých částí vzorku s pevnou fází. Dalším krokem je aplikace vzorku, kdy je důležitá jeho úprava (vhodné pH, ředění, iontová síla) a dostatečný objem a průtok, aby byl zajištěn kontakt vzorku se sorbentem. Mezifází může být sušení, a to v případě, pokud se výrazně liší eluční činidlo od promývacího roztoku. Provádí se buď inertním plynem, nebo proudem vzduchu. Poté následuje propláchnutí kolonky a odstranění zbytků matrice a dalších potenciálních interferujících látek. Analyty stále zůstávají vázány na pevnou fází. Vše je zakončeno elucí analytu, kdy se eluát vymývá z kolonky. Důležité je při tom vhodně zvolit rozpouštědlo a jeho objem. Eluát se dále odebírá a zpracovává, např. chromatografickou analýzou [14, 15].

Složky vzorku se také mohou koncentrovat extrahováním požadovaných složek z velkého objemu vodné fáze a následnou elucí malým množstvím rozpouštědla. Metody zakoncentrování jsou důležité pro stopové analytické metody. Naopak v některých experimentech se extrahují nečistoty na pevnou fází, zatímco analyty procházejí bez retence.

K extrakci na tuhou fází mohou být použity malé jednorázové kolonky nebo jsou k dispozici další formáty jako extrakční disky nebo malé membrány, které mají výhodu v tom, že snižují dobu extrakce a objem rozpouštědla. Kolonka se skládá z plastového těla, stacionární fáze, zátky nebo frity pro udržení stacionární fáze a uzavírací části. Velikost kolonky (neboli tzv. cartridge) závisí na množství látky, která má být zadržena. V případě, kdy nemá odpovídající velikost (množství sorbentu), může dojít ke ztrátě analytu. Rozpouštědlo prochází kolonkou gravitací nebo kvůli zvýšení průtoku za pomoci vyššího/nížšího tlaku. Princip této extrakce je ovlivněn tím, že analyt je zdárně zadržen, pokud má vyšší afinitu k tuhé fázi než k matrici vzorku. K úspěšné retenci dochází pomocí polárních, nepolárních, iontových a afinitních interakcí.

SPE lze také aplikovat v systémech s nepřetržitým tokem, které mohou automatizovat proces zakoncentrování a v porovnání s extrakcí z kapaliny do kapaliny vykazují nižší spotřebu organických rozpouštědel [11-13].

3.2.2. Sorbenty

Při výběru sorbentů musíme brát v potaz vlastnosti vzorku, zjistit o něm co nejvíce informací, a vlastnosti použitého rozpouštědla. Nejlepší retenci analytu dosáhneme tak, že zajistíme, aby polarita analytů byla podobná polaritě sorbentu. Sorbent s optimálními vlastnostmi může poskytnout platformu pro rychlou kinetiku přesunu hmoty analytu, která závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech sorbentu (plocha povrchu a struktura pórů) [11, 14, 15].

Klasické sorbenty

Sorbenty pro SPE dělíme podle použitých fází. Může být použita reverzní fáze (nepolární), příkladem je nepolárně modifikovaný silikagel s C18 a C8. Dále se využívá normální fáze (polární) – zahrnujeme sem silikagel, oxid hlinitý, florisil a polárně modifikovaný silikagel (CN, diol, NH₂). Náleží sem také iontoměniče – anexy a katexy. Jako anex se používá silikagel s chemicky vázaným kladně nabitým modifikátorem (např. kvarterní amin). Jako katex slouží také silikagel, ale s chemicky vázaným záporně nabitým modifikátorem, např. zbytkem organické nebo anorganické kyseliny [11, 14, 15].

Moderní sorbenty

Nové trendy v oblasti sorbentů vznikají s cílem zvýšit selektivitu vůči cílovým analytům, zajistit vyšší sorpční kapacitu, lepší chemické vlastnosti a fyzikálně mechanickou stabilitu.

- *Sorbenty modifikované povrchově aktivními látkami*

V roztocích povrchově aktivních látek nad tzv. kritickou micelární koncentrací se molekuly organizují v micelách. V koncentracích nepatrně pod kritickou micelární koncentrací mohou být povrchově aktivní látky sorbovány na povrch aktivních pevných látek (např. oxid hlinitý, oxid křemičitý) vystavených působení tohoto roztoku. Tím na těchto površích vytvoří monovrstvy nebo dvojvrstvy – hemimicely a admicely. Tyto sorbenty byly popsány jako materiály SPE pro izolaci organických sloučenin. Analyty jsou sorbovány micelárními povrchovými agregáty způsobem známým jako adsolubilizace [16].

- *Smíšené (nebo dvojfázové) sorbenty*
Obsahují další typy materiálů, které jsou současně schopny být neselektivní nebo vysoce selektivní vůči konkrétnímu analytu, při zachování vysoké sorpční kapacity za použití jediného extrakčního kroku. Dříve se používaly skupiny s iontoměničemi na bázi oxidu křemičitého, avšak v dnešní době jsou to materiály na bázi polymerů v závislosti na dalších podmínkách (např. vlastnosti vzorku). Mohou tedy působit jako iontoměniče nebo běžné reverzní fáze [16].
- *Dendrimery*
Jsou složeny z polymerních makromolekul, které jsou vysoce rozvětvené, mají trojrozměrnou strukturu a vysokou funkčnost. Existuje několik typů, které mají uplatnění v různých vědeckých oborech [17].
- *Sorbenty rozpoznávající molekuly*
Většina biochemických reakcí je zprostředkována na cílených biomolekulách, které mají chemickou strukturu takovou, že se mohou selektivně vázat a spouštět požadované reakce nebo přenášet hmotu na buněčné úrovni. Jsou to monoklonální a polyklonální protilátky, RNA a DNA. Mají vysoce specifické rozpoznávací procesy, které mohou být základem pro specifické nebo vysoce selektivní medium pro extrakci na tuhou fázi. Dále se dělí na molekulárně vtištěné polymery, imunosorbenty a aptamery [16, 17].
- *Magnetické nanočástice*
Jedná se o supermagnetický materiál, který může být přitahován magnetickým polem a zároveň po jeho odstranění nezůstává žádný zbytkový magnetismus. Suspenze těchto částic, na které jsou adsorbovány cílové analyty, proto mohou být velmi rychle odstraněny z původních matric pomocí magnetického pole a po odstranění pole nebudou aglomerovat. V aplikaci pro SPE se využívá jejich velký specifický povrch, sorpční kapacita a vysoká selektivita k analytům [17].

- *Nanostruktury*

Nanostruktury se dělí na nanostruktury připravené pomocí elektrostatického zvláknování (kapitola 3.3.) a na uhlíkové nanostruktury.

Uhlíkové nanostruktury interagují s organickými sloučeninami prostřednictvím nekovalentních sil, včetně elektrostatické síly, vodíkových vazeb, Van der Waalsových sil, π - π interakcí a hydrofobní síly. Mají velký poměr povrchu k objemu. Povrchy mohou být také chemicky modifikované na základě vlastností adsorbentů a mohou jim být přizpůsobeny. Zahrnujeme sem grafeny a oxidy grafenu, fullereny, uhlíkaté nanotrubičky, nanovlákná a nanodisky [16-18].

3.3. Nanovlákna

3.3.1. Charakterizace

Nanovlákna jsou podle definice speciálně vyrobená vlákna s průměrem menším než jeden mikrometr a jejich délka je zpravidla o dva a více řádů vyšší. Jsou vysoce pórovitá, jejich průměr závisí na druhu polymeru a způsobu, jakým jsou nanovlákna vyrobena. V praxi jsou většinou seskládána do vyšších struktur a prostorných komplexů. Jsou složena z různých polymerů a díky tomu mají rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti a odlišná aplikační specifika [19-23].

3.3.2. Příprava

Existují různé způsoby pro přípravu nanovláken. Mezi nejpoužívanější patří elektrostatické zvlákňování (tzv. elektrospinning), foukání taveniny, dloužení, použití šablon a fázová separace. V uvedených metodách se nejčastěji využívá elektrostatické zvlákňování. Oproti ostatním technologickým postupům má výhodu v nízkých provozních nákladech a rychlosti výroby nanovláken [21-26].

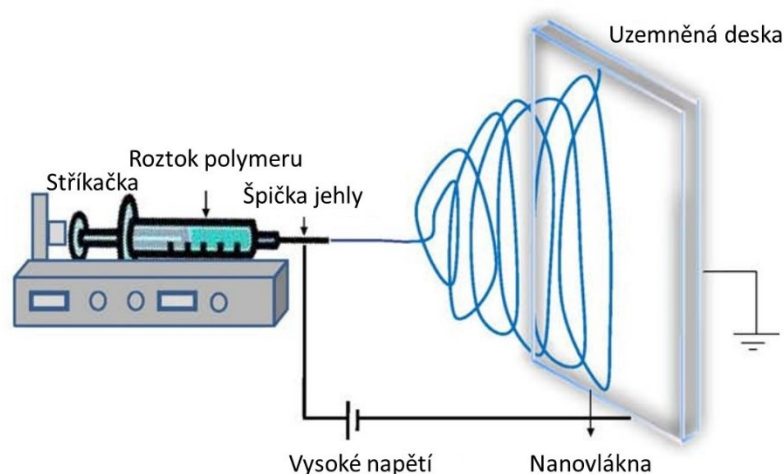
Elektrostatické zvlákňování

Jedná se o jeden z postupů výroby nanovláken, který byl patentován v r. 1934 Antonem Formhalsem. Ten studoval působení elektrického pole na polymerní roztoky s cílem vyrobit nit z jemných vláken. Navrhl experimentální uspořádání pro výrobu polymeru s využitím elektrostatického zvlákňování. Tento proces byl do značné míry zapomenut a dostal se znovu do povědomí až koncem 20. století, kdy vzrostla poptávka po rozvoji nanotechnologií.

Je to metoda, která vytváří nanovlákna pomocí elektricky nabitého pole, díky kterému dochází ke zvlákňování polymerního roztoku nebo polymerní taveniny. V nejjednodušší formě je k elektrostatickému zvlákňování potřeba tryska ve tvaru jehly pro držení polymerního roztoku, dvě elektrody a zdroj stejnosměrného napětí.

První krok celé výroby začíná s kapkou polymeru, která je natažena od špičky jehly do vlákna pomocí vysokého napětí. Špička je elektricky nabitá a náboj způsobí to, že se vlákna ohýbají tak, že pokaždé, když polymerní vlákno udělá smyčku, tak se jeho průměr zmenší. Obecně se k zachycení vláken používá uzemněná deska nebo rotující válec.

Dalším způsobem výroby porézních nanovláken je zvlákňování směsi dvou různých polymerů. Jeden z polymerů je odstraněn po vytvoření vláken rozpouštěním v rozpouštědle, ve kterém je druhý polymer nerozpustný [21-26].



Obrázek 2: Proces elektrostatického zvlákňování

Podmínky pro elektrostatické zvlákňování

Pro rozpouštění polymeru je nezbytné mít k dispozici vhodné rozpouštědlo. Tlak páry rozpouštědla se zvolí tak, aby se rozpouštědlo rychle odpařovalo a aby vlákno udrželo svoji celistvost po dosažení cíle. Zároveň se však nesmí odpařovat příliš rychle, aby vlákno stihlo vytvrdnout před tím, než dosáhne rozměru nanometrů. Při použití těkavých rozpouštědel se během elektrostatického zvlákňování začnou vytvářet oblasti bohaté na rozpouštědlo, které se přeměňují na póry.

Je podstatné, aby viskozita a povrchové napětí rozpouštědla nebyly ani příliš velké, protože by se špička deformovala, a zároveň ani příliš malé, aby se roztok polymeru vypouštěl volně z jehly.

Dostatečný výkon zdroje napájení je důležitý k tomu, aby překonal viskozitu a povrchové napětí polymerního roztoku, kvůli zformování a udržení proudu ze špičky jehly. Mezera mezi špičkou a uzemněným povrchem by neměla být příliš malá, aby se nevytvořila jiskra mezi elektrodami, ale zároveň by měla být přiměřeně velká, aby se rozpouštědlo stihlo odpařit a vznikla vlákna.

Dále je podstatné uspořádání přístrojové techniky – spinneru. Např. při menším průměru jehly vznikají jemnější vlákna. Proces ovlivňuje také použité napětí, okolní teplota, vlhkost nebo elektrické vlastnosti podpůrného – nosného materiálu, např. při

antistatické úpravě vzniká rovnoměrnější vrstva. Záleží na typu zvoleného polymeru, jeho molekulové hmotnosti, použitím rozpouštědla a koncentraci.

Elektrostaticky zvlákněná nanovláknna jsou schopna tvořit vysoce porézní síť s velkým povrchem. Pórovitá struktura je systém, který je dynamický, kde velikost a tvar pórů se mohou měnit, na rozdíl od pevných struktur. Průměr nanovláken se pohybuje kolem 50-100 nm.

Zvláknňují se roztoky nebo taveniny – organické, syntetické i biologické polymery. Proces ovlivňují přidaná aditiva, elektrická vodivost roztoku či taveniny, povrchové napětí a viskozita. Jednotlivé složky procesu na sebe mají navzájem vliv [23-27].

3.3.3. Složení nanovláken použitých v diplomové práci

Nanovláknna, která se připravují elektrostatickým zvlákněním, jsou zhotovena z téměř jakéhokoliv rozpustného polymeru s vysokou molekulovou hmotností. Jejich vzhled a vlastnosti ovlivňují různé parametry jako jsou koncentrace polymeru, viskozita, molekulová hmotnost, aplikované napětí, vzdálenost od špičky k uzemněné desce nebo použité rozpouštědlo.

Úspěšně jsou využívána nanovláknna, která jsou vyrobena z přírodních polymerů, polymerních směsí nebo polymerů, které jsou impregnované nanočásticemi nebo léčivy [26].

Polyamid

Polyamidy (PA) jsou lineární polymery, které jsou charakteristické obsahem amidových jednotek (N-H-C=O) v hlavním řetězci. Vyrábějí se třemi druhy polymerací: polykondenzací ω -aminokarboxylových kyselin, polymerací jejich cyklických aminů a polykondenzací diaminů s dikarboxylovou kyselinou nebo jejich dichloridy. Kombinace uhlovodíkových řetězců a amidových skupin poskytuje polyamidy se speciální polaritou, které lze využít pro extrakční účely. Uhlovodíkový řetězec umožňuje reagovat s různými chemickými sloučeninami v závislosti na polyamidových monomerech, zatímco amidové skupiny umožňují zvlhčení vláken vodou, která je důležitá pro zvýšení přenosu cílových sloučenin ze vzorku na vlákna [28].

Jejich vlastnosti vystihuje odolnost vůči hoření, chemická a mechanická stabilita, výborné dielektrické vlastnosti, schopnost absorpce vody a nepropustnost pro kyslík.

Nylon 6 (polyamid 6) se jeví jako sorbent pro SPE, který je cenově dostupný a dá se opakovaně používat, což snižuje náklady na prováděné analýzy [29].

Vyrábí se z nich technická vlákna (např. kordy do koster pneumatik a dopravních pásů) nebo textilní vlákna (hedvábná, kobercová). Textilie se lehce zašpiní, jelikož se snadno nabíjejí statickou elektřinou [30, 31].

Polyvinylidenfluorid

Polyvinylidenfluorid (PVDF) se připravuje polymerací vinylidendifluoridu. Je vysoce inertní, mimořádně UV stabilní a odolný proti záření. K jeho znakům patří přirozená samozhášivost, velmi nízká úroveň zachycení mikroorganismů a chemická odolnost proti teplu. Využití má v nátěrových hmotách nebo jako materiál pro výrobu dílů používaných v chemickém průmyslu. Aplikuje se také ve formě membrány, která je dobře hydrofobní a chemicky stabilní a slouží k mikrofiltraci a ultrafiltraci [32-34].

3.3.4. Využití nanovláken

Elektrospinning má jedinečnou schopnost vyrábět nanovlákná z různých materiálů, s rozdílnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi. V současné době může být u nanovláken snadno kontrolována nejen morfologie, pórovitost, ale i další aspekty. Relativně vysoká produktivita umožňuje uplatnění elektrostatického zvlákňování v oborech, které mají odlišná zaměření. Jejich využití sahá od zdravotnictví, přes biotechnologie, enviromentální inženýrství až po armádu [26].

Zdravotnictví

Díky nanotechnologiím se začínají využívat nové trendy v léčení, které výrazně snižují náklady na zdravotní péči. Pomocí *elektrospinningu* mohou být ze syntetických i přírodních polymerů vyrobena nanovlákná s řízenou morfologií a funkcí, která mohou být využita při opravě a regeneraci tkání nebo orgánů. Jsou totiž schopna napodobovat extracelulární matrice tkání a orgánů a měnit tvar na základě měnící se teploty.

Dále se používají jako vektory, které uvolňují léčiva a terapeutika a mohou to být slibné nástroje pro řízené dávkování léčiv a cílených terapeutik.

S nanovlákný jsou také konjugovány biologické a chemické ligandy, které slouží jako specifické biosenzory pro zprostředkování řízeného dávkování inzulínu u pacientů s diabetem reagující na fyziologické změny. V diagnostických lékařských přístrojích slouží jako filtry nepropustné pro bakterie a virové částice. Nacházejí se také

v ochranných textiliích proti enviromentálním a infekčním původcům v nemocnicích, kde se aplikují jako obvazy na poranění, u kterých se preferuje z počátku vyšší a poté prodloužené uvolňování antibiotik [26, 27].

Analytická chemie

Nanovlákná vyrobená elektrostatickým zvlákňováním jsou vynikajícím materiálem pro přípravu membrán, jelikož mají velmi výhodné vlastnosti jako je vysoká pórovitost, propojitelnost, mikroměřítka intersticiálního prostoru a velký poměr povrchu k objemu. Takové membrány se používají při čištění proteinů a odpadních vod, kdy na nanovlákná mohou být připojeny další ligandové molekuly nebo biomakromolekuly [26].

Existuje velké množství procesů modifikace materiálů před a po elektrostatickém zvlákňování, které umožňují rozšířit spektrum materiálů a jejich použití jako sorbenty pro SPE [18]. Mají lepší extrakční kinetiku a kapacitu extrakce. Díky jejich univerzálnosti, stabilitě a velkému povrchu se jeví jako slibný materiál a poskytují dobrý stupeň selektivity k cíleným molekulám. Všestrannost polymerů můžeme vnímat z několika odlišných hledisek. Buď mohou být získány z různých polymerů pokrývajících širokou škálu funkčních vlastností, a proto mohou být přizpůsobeny definovanému analytickému problému. Nebo mohou být získány v různých formách (např. vlákna, membrány, ve vrstvách nebo v kuličkách) a poměrně levně a jednoduše. Univerzálnost těchto nanovláken poslední dobou roste kvůli vývoji kompozitů, které jsou připraveny kombinací dvou různých polymerů nebo kombinací polymerů s nanočásticemi.

Optimalizace výroby nanovláken způsobila zlepšení především fyzikálně chemických vlastností a mechanické pevnosti oproti stávajícím sorpčním materiálům. Lépe tím můžeme předvídat vlastnosti sorbentu. Sorbenty z nanovláken nacházejí značné uplatnění v extrakci na tuhou fázi. Používají se různé typy nanočástic, které mohou být obměňovány pomocí organických a anorganických molekul [28].

Používání nanovláken a nanomateriálů v mikroextrakci na pevnou fázi patří mezi nejčastěji užívané metody extrakce pomocí nanovláken před stanovením vysoce účinnou kapalinou chromatografií, plynovou chromatografií nebo jinými separačními technikami s vhodnou detekcí. V kapalinové chromatografií mají dobrý potenciál pro zjednodušení kroku čištění vzorku a pro urychlení analytického procesu [35].

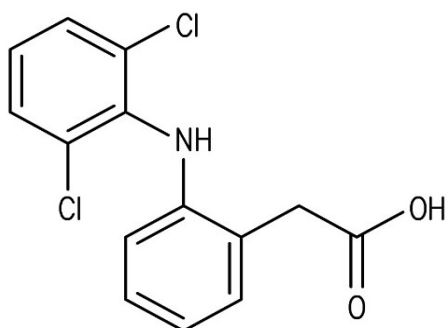
Využívají se také afinitní membrány, které na svůj povrch zachycují specifické cílové molekuly. Působí jako nosič reaktivního materiálu, který přitahuje toxické ionty těžkých kovů (např. As, Cr, Pb) pomocí adsorpčních/chemisorpčních a elektrostatických

afinitních mechanismů. Mají uplatnění při odstranění organického odpadu a těžkých kovů při úpravě vody, jelikož tyto látky mohou způsobit vážné poškození lidského zdraví a životního prostředí [28].

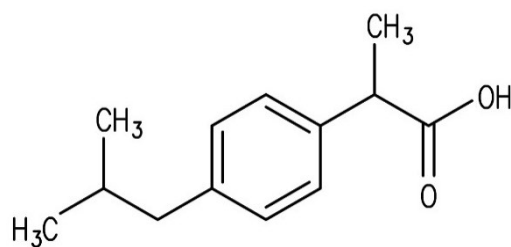
3.4. Analyzované látky

Nesteroidní antiflogistika

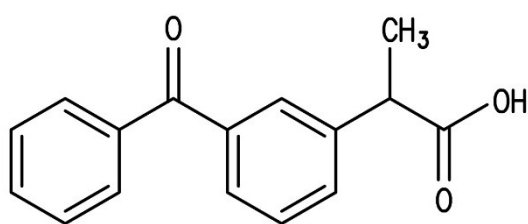
Nesteroidní antiflogistika (NSAIDs) jsou velká skupina léčiv, která slouží k léčení revmatických onemocnění, bolestí všeho druhu, snižují horečku a zánětlivé procesy. Působí na metabolismus prostaglandinů a tím ovlivňují inhibici cyklooxygenázy, čímž se snižuje citlivost nociceptorů ke stimulaci a dráždění. V diplomové práci byly použity deriváty kyseliny octové – diklofenak, a kyseliny propionové – ibuprofen, ketoprofen, naproxen (obrázek 3) [36, 37].



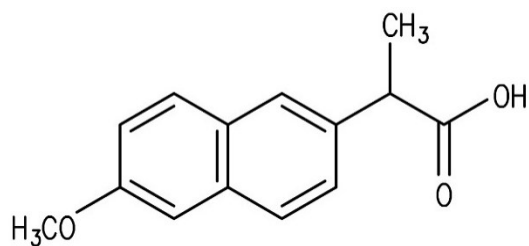
Diklofenak



Ibuprofen



Ketoprofen



Naproxen

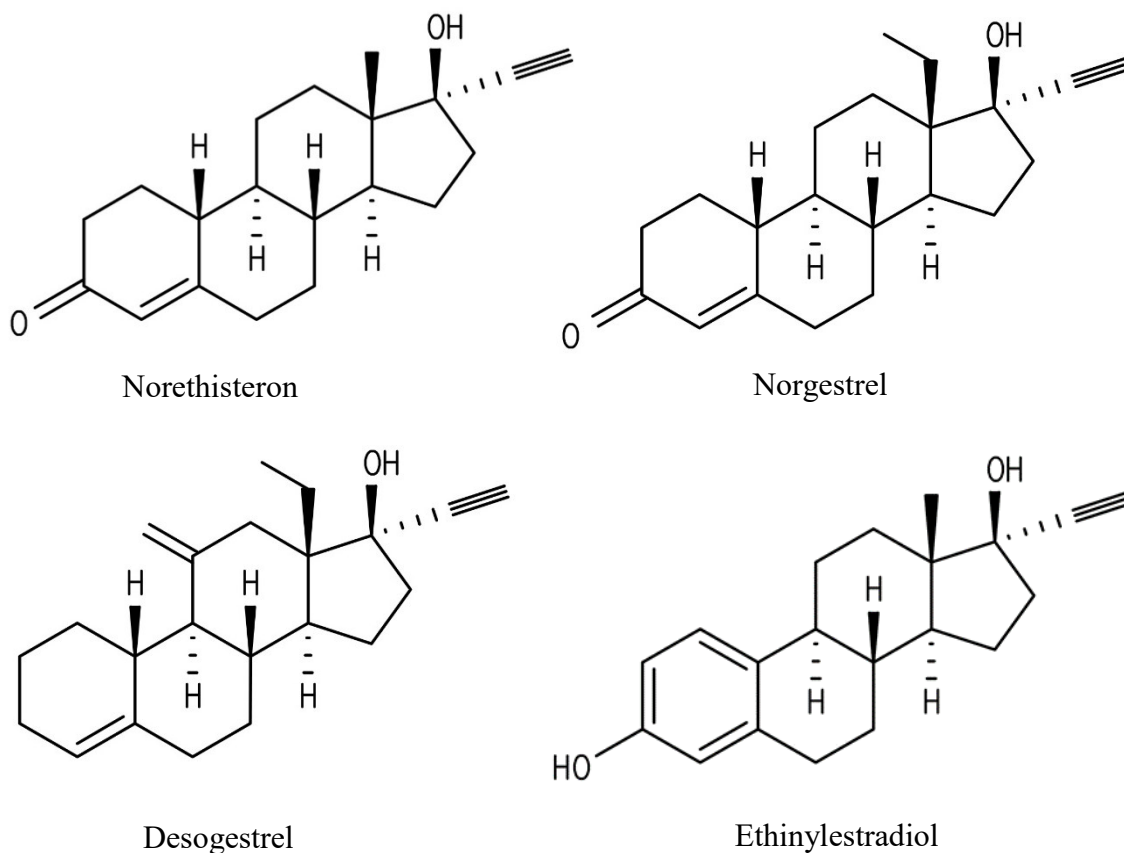
Obrázek 3: Struktury modelových analytů ze skupiny NSAID

Ženské pohlavní hormony

Estradiol a progesteron jsou přirozené hormony, které produkují vaječníky za ovlivnění gonadotropinů z předního laloku hypofýzy. Estradiol a látky podobně účinkující jsou estrogeny (např. ethinylestradiol). Progesteron a jemu podobné látky nazýváme gestageny. Přirozené hormony však nejsou vhodné pro perorální podání, protože z větší části prochází presystémovou eliminací v játrech, proto se často používají jejich syntetické deriváty.

Estrogeny a gestageny mají steroidní strukturu, přičemž gestageny jsou deriváty 19-nortestosteronu a mohou být ethinylované nebo neethinylované. Mezi ethinylované patří estrany (např. norethisteron) a gonany (např. desogestrel, norgestrel).

K nejčastějším indikacím patří hormonální kontracepce, kdy se terapie estrogeny musí doplňovat pomocí gestagenů v souladu s menstruačním cyklem ženy, aby nevznikla hyperplazie endometria a eventuálně karcinom endometria. Dále se užívají v substituční terapii při nedostatku hormonů, nepravidelném cyklu, dysmenorei, potlačují klimakterické obtíže a zabraňují rozvoji osteoporózy [36, 37].

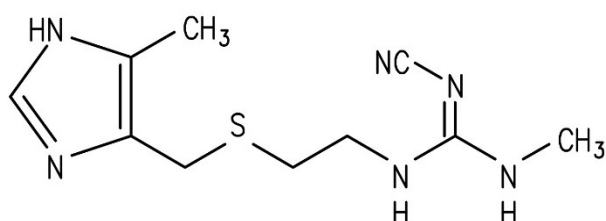


Obrázek 4: Struktury ženských pohlavních hormonů

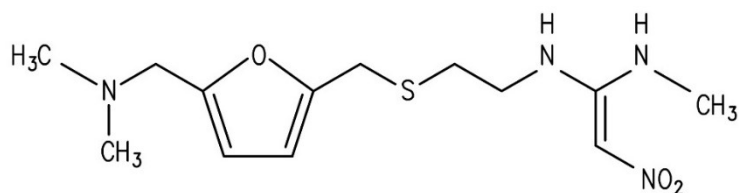
H₂ antihistaminika

Jako H₂ antihistaminika jsou označovány látky, které tlumí histaminem podmíněnou sekreci žaludeční kyseliny. V krycích buňkách žaludku jsou přítomny histaminové H₂ receptory, jejichž stimulace histaminem zvýší sekreci HCl. Při patologických stavech, jako jsou duodenální vředy, žaludeční vředy při hyperaciditě, gastritidě nebo refluxní chorobě jícnu, je nutné snížit produkci kyseliny.

Mezi starší H₂ antihistaminika patří cimetidin, který může značně interagovat a ovlivňovat metabolismus dalších léčiv. V jeho chemické struktuře je imidazolové jádro, na které je navázán flexibilní thiabutylový řetězec zakončený nebazickým polárním seskupením. Ranitidin je novější sloučenina, která nezpůsobuje interakce. Obsahuje furanový kruh, který je substituován bazickou skupinou [36-38].



Cimetidin

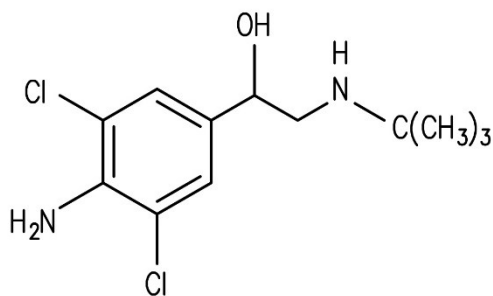


Ranitidin

Obrázek 5: Struktury modelových analytů ze skupiny H₂ antihistaminik

Klenbuterol

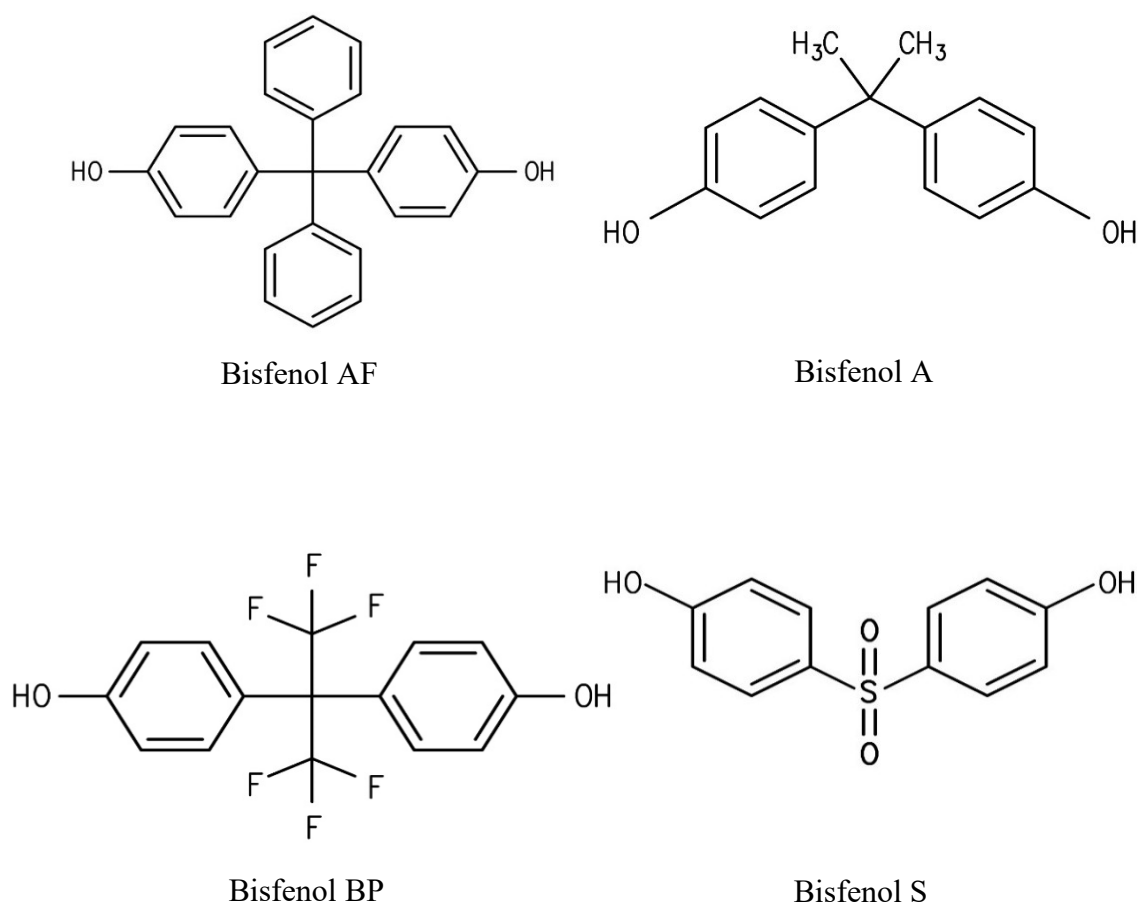
Klenbuterol je selektivní β_2 sympatomimetikum. Základem struktury je molekula isoprenalinu a sekundární alkoholická hydroxylová skupina na β uhlíku fenylethylaminu. Je indikován v terapii bronchiálního astmatu a chronické obstrukční nemoci. Při perorálním podání dosahuje bronchů krevní cestou a tím může mít zvýšené riziko celkových nežádoucích účinků. Pomalu se eliminuje z organismu [36, 37].



Obrázek 6: Struktura klenbuterolu

Bisfenoly

Jedná se o organické sloučeniny se dvěma fenolovými funkčními skupinami. U většiny je základ struktury tvořen difenylmethanem. Vyrábí se pro různé aplikace v průmyslových a spotřebních výrobcích. Jsou využívány jako výchozí látka při polymeraci polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic. Polykarbonát je vysoce průhledný a tuhý plast, který se užívá při výrobě obalů potravin a nápojů. Epoxidovými pryskyřicemi se potahují vnitřky plechovek, konzerv a víček od lahví. Bisfenol A může v malých množstvích přecházet do nápojů a potravin, které jsou uchovávány v obalech, které obsahují tuto látku, proto jsou jeho rezidua a jejich vliv nejen na lidské zdraví neustále studovány [39-43]. Struktury vybraných bisfenolů jsou na obrázku 7.



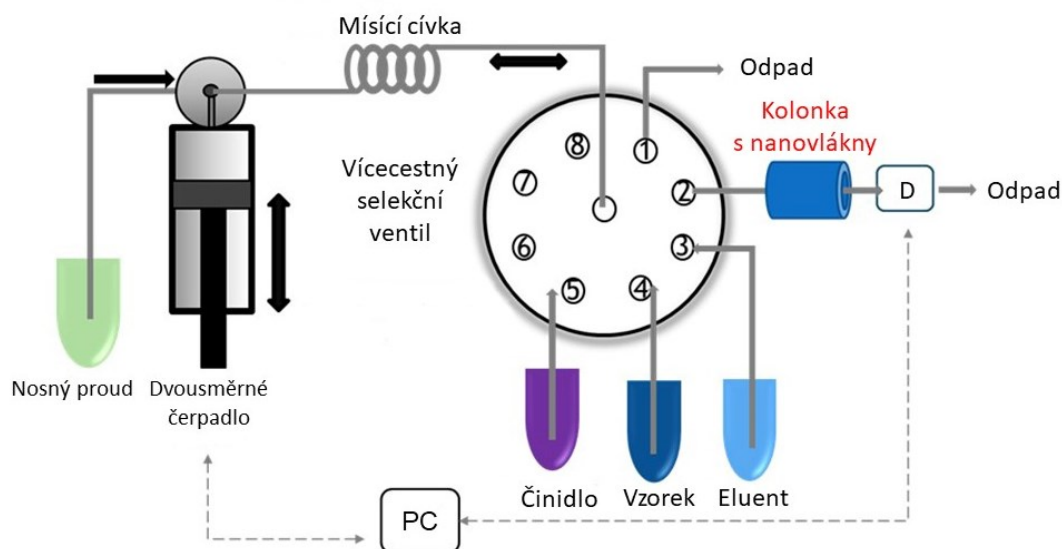
Obrázek 7: Struktura vybraných bisfenolů

4. Experimentální část

4.1. Přístrojové vybavení a pomůcky

- FIALab[®] 3500 systém (FIALab[®] Instrument Systems Inc., Bellevue, USA), kterého součástí bylo:
 - 5 ml skleněné čerpadlo s třicestným ventilem,
 - chemicky inertní osmicestný selekční ventil,
 - polytetrafluorethylenové (PTFE) hadičky s průměrem 0,8 mm,
 - mísicí cívka umístěná mezi centrální port selekčního ventilu a port „OUT“ třicestného ventilu.
- Spektrofotometr USB 2000 (Ocean Optics, Ocean Optics Inc., Dunedin, USA),
- UV lampa Model D 1000 (Ocean Optics Inc., Dunedin, USA) jako zdroj světla je připojena k detekční cele přes optická vlákna stejně jako detektor,
- Software FIALab[®] pro Windows, verze 5.11.10 (FIALab[®] Instrument Systems Inc., Bellevue, USA),
- Kolonka z polymethylmetakrylátu (PMMA) s délkou 1,0 cm a průměrem 0,5 cm umístěná mezi port č. 2 a detekční celu.

Schéma použitého průtokového systému je zobrazeno na obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma použitého systému SIA s kolonkou s nanovláknky

4.2. Použité chemikálie

Nanovlákná byla vyrobena a poskytnuta Technickou univerzitou v Liberci, která je vyrábí elektrostatickým zvláknováním pomocí technologie Nanospider™. Použitá nanovlákná jsou uvedena v tabulce 1.

Standardy modelových látek: diklofenak, ibuprofen, indometacin, naproxen, desogestrel, ethinylestradiol, norethisteron, norgestrel, cimetidin, raniditin, klenbuterol, bisfenol A, bisfenol BP, bisfenol AF, bisfenol S – byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Česká republika. Jejich fyzikálně – chemické vlastnosti jsou uvedené v tabulce 2.

Kyselina chlorovodíková – Penta, Praha, Česká republika

Hydroxid sodný – Penta, Praha, Česká republika

Methanol – VWR Chemicals, Stříbrná Skalice, Česká republika

Destilovaná voda – systém MilliQ, Millipore

Tabulka 1: Typy nanovláken

Typ nanovlákná	Použitá zkratka	Struktura
Polyamid	PA	$\left[(\text{CH}_2)_n - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{NH} \right]$
Polyvinylidenfluorid	PVDF	$\left[\begin{array}{cc} \text{H} & \text{F} \\ & \\ -\text{C} & - & \text{C}- \\ & \\ \text{H} & \text{F} \end{array} \right]_n$

Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti modelových látek

Analyt	LogP	pKa	Amax
Diklofenak	4,51	4,15	275
Ibuprofen	3,97	4,91	264
Ketoprofen	3,12	4,45	262
Naproxen	3,18	4,15	230
Desogestrel	4,00	17,99	210
Ethinylestradiol	3,67	10,33	280
Norethisteron	2,97	17,59	240
Norgestrel	3,25	17,91	241
Cimetidin	0,40	6,80	225
Ranitidin	0,79	8,08	314
Klenbuterol	2,94	14,06	254
Bisfenol A	3,30	9,60	240
Bisfenol BP	5,60	*	240
Bisfenol AF	4,50	9,20	275
Bisfenol S	1,65	8,20	295

* Nenalezeno v literatuře

4.3. Příprava roztoků a kolonky

Roztoky byly připravovány do skleněných odměrných baněk s vhodně zvoleným objemem. K doplnění do požadovaného objemu a koncentrace byla použita destilovaná voda nebo methanol. Roztoky byly skladovány v lednici a vždy před měřením byly vytaženy, aby dosáhly laboratorní teploty.

4.3.1. Příprava zásobních roztoků a elučních činidel

Zásobní roztoky nesteroidních antiflogistik a H₂ antihistaminik o koncentraci 500 mg/l byly připraveny navážením 25 mg dané látky a doplněním methanolem po značku do 50 ml odměrné baňky. Zásobní roztoky norethisteronu o koncentraci 19 mg/l, norgestrelu (416 mg/l), desogestrelu (23 mg/l) a ethinylestradiolu (600 mg/l) v methanolu byly k dispozici na Katedře analytické chemie.

Eluční roztoky methanolu o koncentraci 10, 25, 50, 70 a 90% v/v byly připravené odměřením 10, 25, 50, 70 a 90 ml methanolu a příslušných objemů vody a smísením ve 100 ml láhvi. Před použitím v systému byly odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu tří minut.

Kyselina chlorovodíková o koncentraci 10 mmol/l byla připravena zředěním dvěstěkrát kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 2 mol/l destilovanou vodou do 50 ml odměrné baňky.

Hydroxid sodný o koncentraci 10 mmol/l byl připraven zředěním dvěstěkrát hydroxidu sodného o koncentraci 2 mol/l destilovanou vodou do 50 ml odměrné baňky.

4.3.2. Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky ibuprofenu, diklofenaku, ketoprofenu a naproxenu o koncentraci 10 mg/l byly připraveny zředěním zásobních roztoků destilovanou vodou do 10 ml odměrných baněk.

Roztok ethinylestradiolu o koncentraci 10 mg/l byl připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 600 mg/l pipetováním 167 μ l do 10 ml odměrné baňky a doplněním vodou po značku. Roztok norethisteronu o koncentraci 10 mg/l byl připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 19 mg/l pipetováním 5263 μ l do 10 ml odměrné baňky a doplněním vodou po značku. Roztok norgestrelu o koncentraci 10 mg/l byl připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 416 mg/l pipetováním 240,3 μ l do 10 ml odměrné baňky a doplněním vodou po značku. Roztok desogestrelu o koncentraci 10 mg/l byl připraven ze

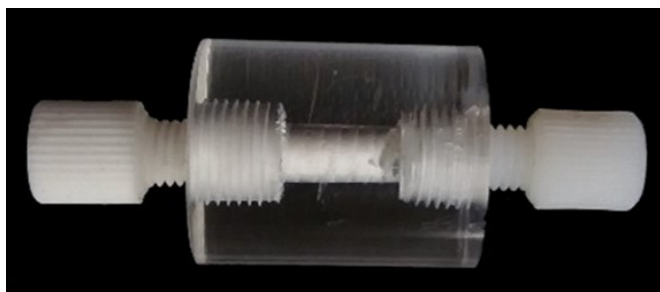
zásobního roztoku o koncentraci 23 mg/l pipetováním 4348 μ l do 10 ml odměrné baňky a doplněním vodou po značku.

Roztoky H₂ antihistaminik cimetidinu a ranitidinu o koncentraci 10 mg/l byly připraveny naředěním zásobního roztoku o koncentraci 500 mg/l destilovanou vodou do 10 ml odměrných baněk.

Roztoky klenbuterolu a bisfenolů byly připraveny pipetováním 200 μ l příslušných zásobních roztoků do 10 ml odměrných baněk a doplněním destilovanou vodou po rysku na koncentraci 10 mg/l.

4.3.3. Příprava kolonky s nanovlákný

Nanovlákná se před plněním do kolonky musela vystříhnout z větší dodané textilie. Do kolonky bylo vměstnáno vždy dostatečné množství jednoho typu nanovlákná pomocí plastové pinzety tak, aby kolonka byla téměř zcela zaplněna. Do systému SIA byla kolonka upevněna pomocí konektoru s ferulkou. Kolonka byla umístěná před detektor a pro spojení byly použité co nejkratší hadičky, aby před detekcí nedošlo k disperzi eluátu. Kolonka s nanovlákný je zobrazená na obrázku 9.



Obrázek 9: Kolonka z polymetylmakrylátu naplněná nanovlákný

4.4. Metoda měření

Před začátkem prvního měření byl vždy nejprve promyt celý SIA systém destilovanou vodou, kdy přes každou hadičku byl aspirován určitý objem destilované vody a vše bylo směřováno do odpadu. Pak následovalo kondicionování kolonky s nanovláknou pomocí 90% methanolu. Dále byla nastavena vhodná vlnová délka podle analyzovaných látek na spektrofotometru a srovnávací vlnová délka.

Samotné měření obecně probíhalo tak, že pomocí čerpadla bylo naaspirováno 2000 μl nosného proudu (destilované vody) rychlostí 200 $\mu\text{l/s}$. Poté proběhla aspirace vzorku příslušným portem o objemu 10 μl rychlostí 25 $\mu\text{l/s}$. Vzorek byl směřován do kolonky s nanovláknou přes port č. 2 a následně se aktivovalo měření absorbance spektrofotometrem. Dále bylo naaspirováno do systému 200 μl elučního činidla rychlostí 100 $\mu\text{l/s}$. Eluční činidlo prošlo skrz kolonku s nanovláknou rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$ a následovalo měření eluce pomocí spektrofotometru. Byla tedy sledována jak dávkovací fáze, tak i eluční fáze extrakčního procesu. Opakování celé analýzy probíhalo zpravidla 3x. Program je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Základní příkazy a vysvětlení použité v analýze

Příkaz	Objem	Průtoková rychlost	Port	Vysvětlení
Aspirate	2000 μl	200 $\mu\text{l/s}$	Valve In	Aspirace nosného proudu
Aspirate	10 μl	25 $\mu\text{l/s}$	4	Aspirace vzorku
Dispense Spectrophotometer Absorbance Scanning Spectrophotometer Stop Scanning	1000 μl	10 $\mu\text{l/s}$	2	Dávkování vzorku Měření absorbance Stop měření
Aspirate	200 μl	100 $\mu\text{l/s}$	2	Aspirace elučního činidla
Empty Spectrophotometer Absorbance Scanning Spectrophotometer Stop Scanning		10 $\mu\text{l/s}$	3	Eluce Měření absorbance Stop měření

*za každým krokem byl vložen příkaz „Delay until done“

5. Výsledky a diskuze

5.1. Předběžné experimenty

5.1.1. Optimalizace objemu vzorku

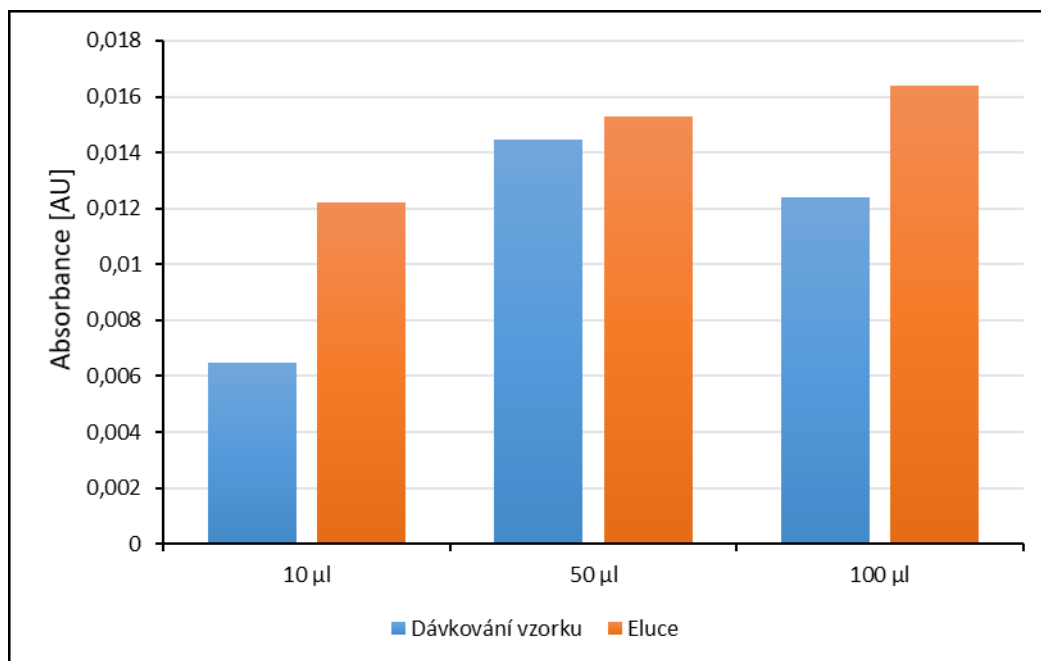
Pro první experimenty byly zvoleny nanovlákná typu PA. Byla naplněna do kolonky tak, aby se dosáhlo co nejmenšího mrtvého objemu. Počáteční podmínky měření byly zvoleny následovně: objem vzorku 100 μl , objem eluční fáze 200 μl . Jako eluční činidlo se použil 50% methanol. Průtoková rychlost dávkování vzorku i eluční fáze byla 10 $\mu\text{l/s}$. Jako první modelové analyty byly testované roztoky ženských pohlavních hormonů, a to norgestrelu o koncentraci 416 mg/l, resp. 41,6 mg/l a desogestrelu o koncentraci 23 mg/l. Výsledky ukázaly, že je potřebné optimalizovat parametry metody.

Jedním z prvních kroků byla optimalizace objemu dávkování vzorku, kdy byl zkoušenou látkou desogestrel o koncentraci 23 mg/l, elučním činidlem byl 25% methanol a rychlost dávkování vzorku byla 10 $\mu\text{l/s}$. Byly zkoušeny objemy vzorku 10, 50 a 100 μl .

Z grafu je patrný výsledek, kdy poměr eluce a dávkování vzorku vykazuje nejvyšší rozdíl při objemu 10 μl a přibližný odhad retence je 63%, což je nejvyšší hodnota z uvedených výsledků. Přibližná retence se byla vypočítána dle vzorce:

$$Retence = \frac{A_e}{A_e + A_d} * 100\% \quad \text{Rovnice 1}$$

kde A_e je výška píku eluce a A_d je výška píku dávkování.



Graf 1: Optimalizace dávkování objemu vzorku desogestrelu

5.1.2. Optimalizace průtokové rychlosti dávkování vzorků

Dalším optimalizovaným parametrem byla rychlost dávkování vzorku při průtokových rychlostech 10 µl/s a 5 µl/s při objemech vzorku 25, 10 a 5 µl. Analyzovanou látkou byl norgestrel o koncentraci 41,6 mg/l a elučním činidlem byl 50% methanol. Z výsledků, které jsou uvedeny v tabulce 4 vyplývá, že k nejvyššímu záchytu analytu při všech použitých objemech dochází při použití rychlosti 10 µl/s. Vyšší průtokové rychlosti nebyly testovány z důvodu použité instrumentace a možnosti zvýšeného zpětného tlaku.

Tabulka 4: Průtoková rychlost dávkování vzorku 10 µl/s a 5 µl/s při různých objemech

	10 µl/s	5 µl/s
Objem [µl]	Retence [%]*	Retence [%]*
25	85,85	74,68
10	91,48	90,04
5	92,34	86,87

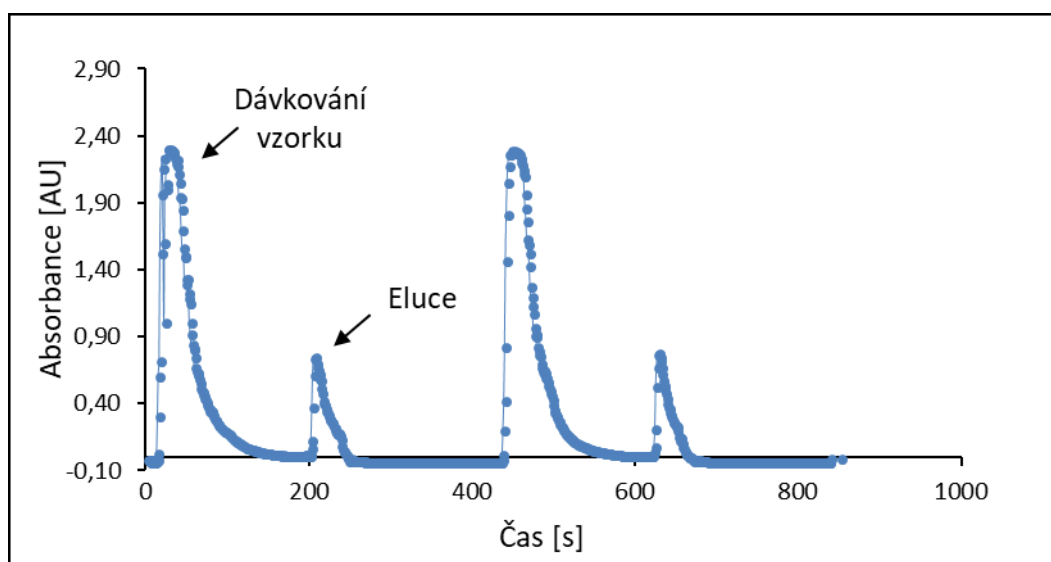
* Spočítáno dle rovnice 1

5.2. Polyamidová nanovlákna

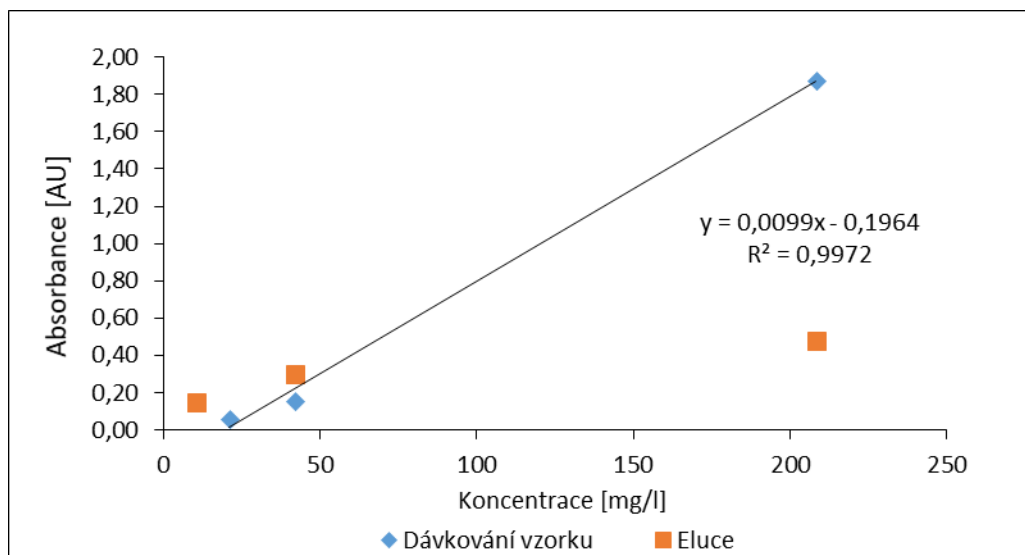
5.2.1. Ženské pohlavní hormony

Do kolonky byla vměstnána polyamidová nanovlákna. Modelovým analytem pro předběžný test látek se steroidní strukturou byl zvolen norgestrel o koncentraci 416 mg/l. Analýza probíhala dle programu uvedeného v kapitole 4.4. Metoda měření, s tím rozdílem, že dávkování vzorku probíhalo rychlostí 5 $\mu\text{l/s}$, z důvodu pozorovaného vysokého zpětného tlaku způsobeného naplněnou kolonkou při rychlosti 10 $\mu\text{l/s}$. Elučním činidlem byl 50% methanol.

U analytu norgestrelu pozorujeme v dávkovací fázi vyšší pík než v eluční fázi, který znamená, že má analyt slabou retenci. Nevykazuje výraznou afinitu k nanovláknům typu PA. Výsledky jsou uvedeny v grafu 2. Zároveň je možno pozorovat, že hodnota absorbance je vyšší než 2, z toho důvodu byly dále zkoušeny nižší koncentrace vzorku 208 mg/l, 41,6 mg/l a 20,8 mg/l. Z grafu 3 vyplývá, že můžeme použít vzorky o nižší koncentraci než 208 mg/l, protože zvyšováním koncentrace látky je kolonka nasycena – dochází jenom k lineárnímu zvýšení výšky píku při dávkování, výška elučního píku zůstává nezměněná.



Graf 2: Výsledky měření norgestrelu na PA nanovlákněch

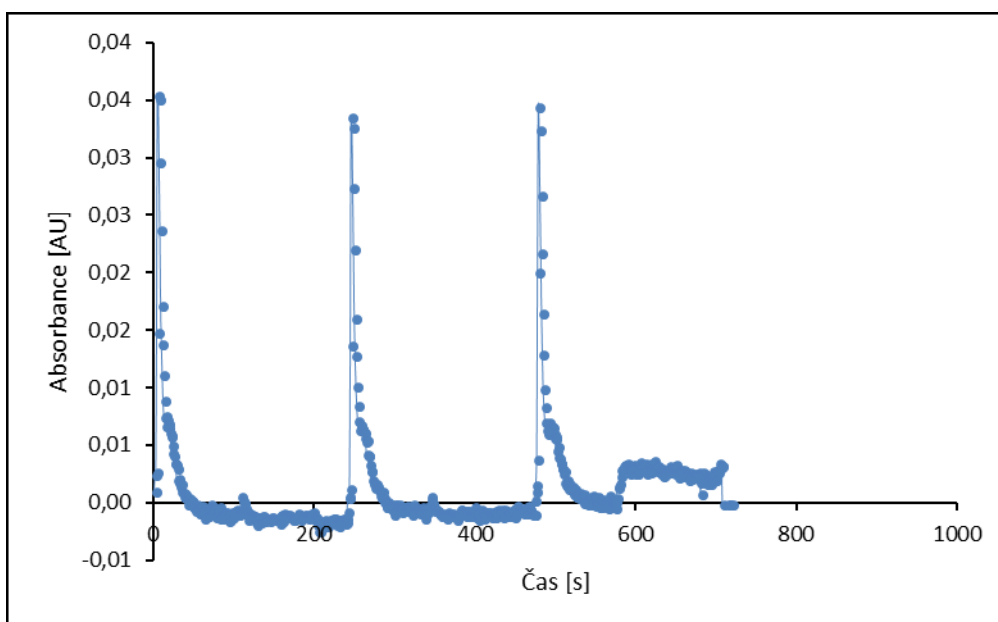


Graf 3: Analýza norgestrelu o různých koncentracích vzorku

5.2.2. Klenbuterol

Další testovanou látkou byl klenbuterol o koncentraci 10 mg/l. Podmínky měření byly stejné jako v kapitole 4.4. Metoda měření. Dávkování vzorku bylo z důvodu zvýšeného zpětného tlaku při průtokové rychlosti 10 $\mu\text{l/s}$ sníženo na rychlost 5 $\mu\text{l/s}$. Jako elučňi činidlo byl použit 50% methanol.

Můžeme konstatovat, že nebyla shledána žádná retence u analytu klenbuterolu na nanovláčknech PA. Ve výsledcích měření v grafu 4 byla pozorována pouze fáze dávkování vzorku, kdy se pravděpodobně žádný analyt na nanovláčknech nezachytil. V dalších měřeních byly měněny parametry jako objem aspirovaného vzorku, objem elučňi činidla nebo koncentrace elučňi činidla – vše bez žádoucího výsledku.

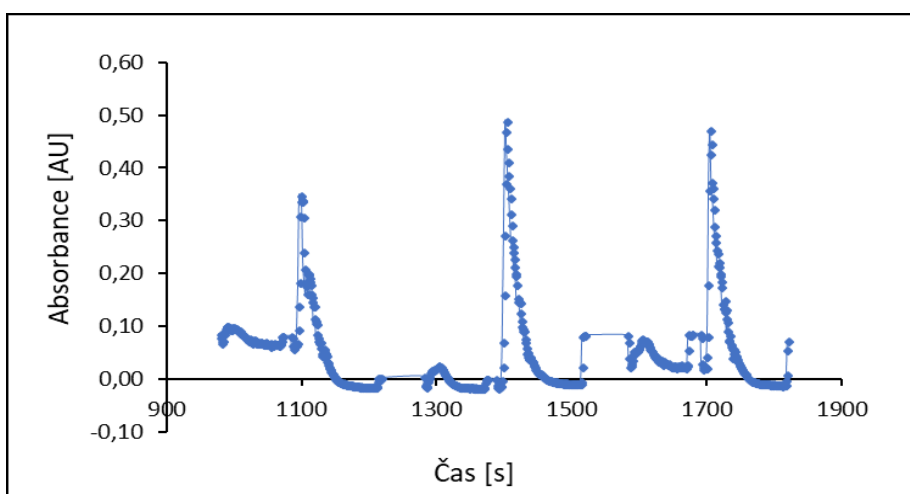


Graf 4: Výsledky měření analytu klenbuterol s PA nanovláčkny

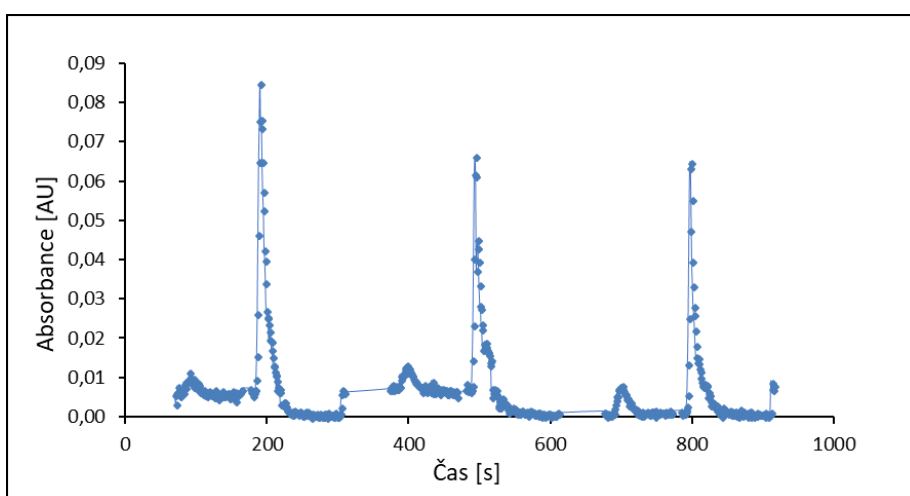
5.2.3. H₂ antihistaminika

Analýza probíhala s určitými změnami, vzhledem k hodnotám pK_a analytů cimetidinu a ranitidinu s koncentrací 10 mg/l. Po nasátí nosného proudu následovalo nasátí 20 µl vzorku a 5 µl 10 mmol/l hydroxidu sodného. Tento proces se opakoval pětkrát. Cílem bylo dosáhnout, aby látky v dávkovací fázi nebyly disociované. Pak následovalo dávkování vzorku na vlákna PA, měření pomocí spektrofotometru a eluční fáze. Jako eluční činidlo byl použit 70% methanol ve směsi s kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 10 mmol/l.

Na základě měření je možné konstatovat, že obě látky mají dobrou afinitu k použitým nanovláknům. Ve fázi dávkování vzorku na kolonku není pozorován žádný pík, z čehož možno usoudit, že dochází k záchytu většiny látky na sorbentu. Látka pak byla z PA nanovláken eluována.



Graf 5: Výsledky měření cimetidinu na PA nanovláčknech



Graf 6: Výsledky měření ranitidinu na PA nanovláčknech

5.3. Polyvinylidenfluoridová nanovlákna

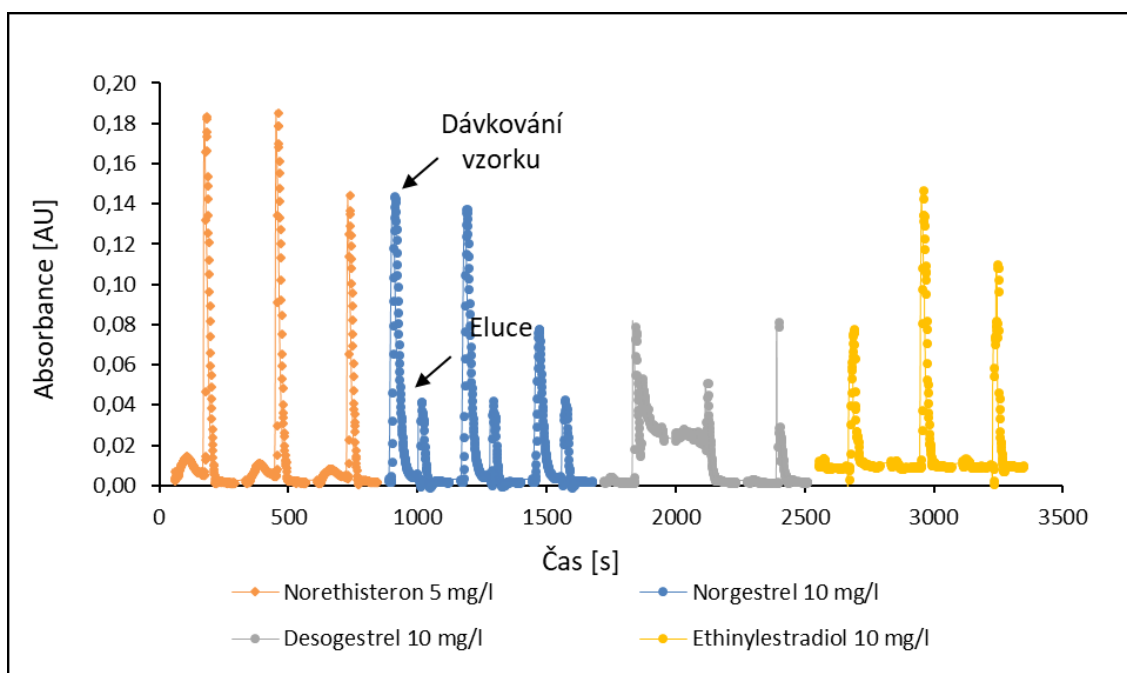
Dalším typem testovaných nanovláken, která byla vložena do kolonky byl typ PVDF o navážce 0,0790 g.

5.3.1. Ženské pohlavní hormony

Jako modelové analyty byly použity norethisteron o koncentraci 5 mg/l, desogestrel, norgestrel a ethinylestradiol o koncentraci 10 mg/l. Elučním činidlem byl 50% methanol. Na spektrofotometru byly použity vlnové délky uvedeny v tabulce 2.

Analýza probíhala dle programu v kapitole 4.4. Metoda měření s tím rozdílem, že bylo aspirováno 100 μ l vzorku a 200 μ l elučního činidla.

Z uvedeného grafu 7 vyplývá, že se estrogény z určité míry zachytávají na nanovlákněch typu PVDF. U všech analytů je vidět, že byla detekována proběhlá eluční fáze. Záchyt probíhal pravděpodobně díky lipofilní povaze steroidních struktur a velikosti jejich molekuly. Na rozdíl od ostatních analytů se norgestrel téměř nezadržel kvůli rozdílným hodnotám pKa a logP oproti ostatním analytům, naopak u norethisteronu byla zaznamenána téměř kompletní retence. Při měření desogestrelu nastala chyba měření, kdy byly aspirovány bublinky, které rušily signál. U ethinylestradiolu je nutno zlepšit opakovatelnost měření, jelikož odchylka výšky píků dosahovala až 26,7%.

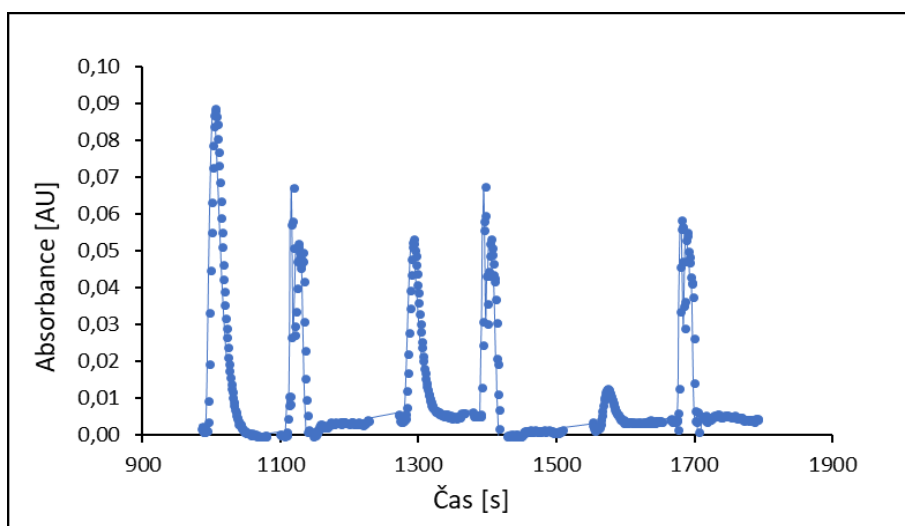


Graf 7: Výsledky měření analytů ženských pohlavních hormonů

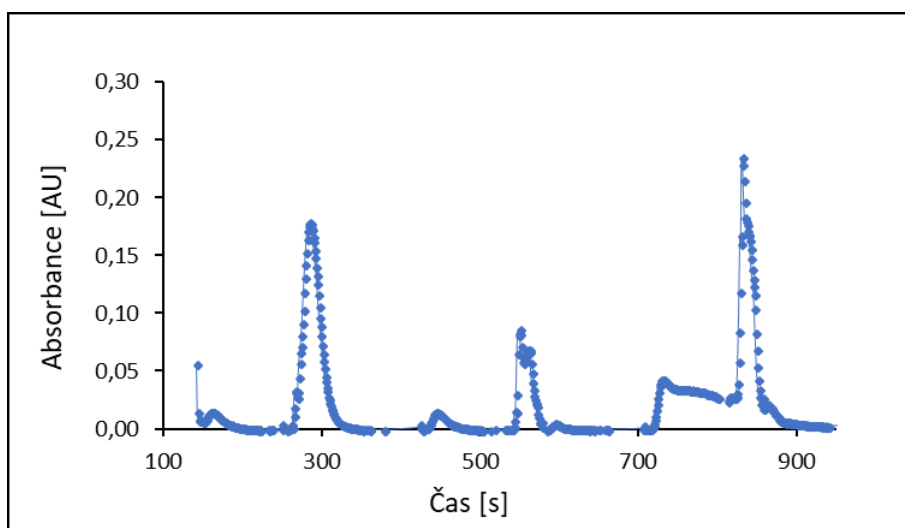
5.3.2. H₂ antihistaminika

Analýza probíhala vzhledem k pKa vybraných analytů obdobně jako u nanovláken typu PA a to tak, že po aspiraci nosného proudu následovalo nasátí vzorku a hydroxidu sodného. Pro lepší promísení se tento postup opakoval 5x. Elučním činidlem byl opět 70% methanol ve směsi s kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 10 mmol/l. Spektrofotometr byl nastaven dle tabulky 2 pro hodnoty absorpčních maxim cimetidinu a ranitidinu.

Ve fázi dávkování vzorku byl pozorován u ranitidinu menší pík než ve fázi eluce, z čehož je možno soudit, že dochází k záchytu látky na sorbentu. Průměrná úroveň retence spočtená z prvních dvou měření cimetidinu je 49,8%. U měření ranitidinu není možné hodnotit záchyt látky na nanovlákněch z důvodu špatné opakovatelnosti měření. Minimální výška píku v dávkovací fázi však naznačuje dobrou retenci látky za daných podmínek na vlákněch typu PVDF.



Graf 8: Výsledky měření analytu cimetidin s PVDF nanovláknky



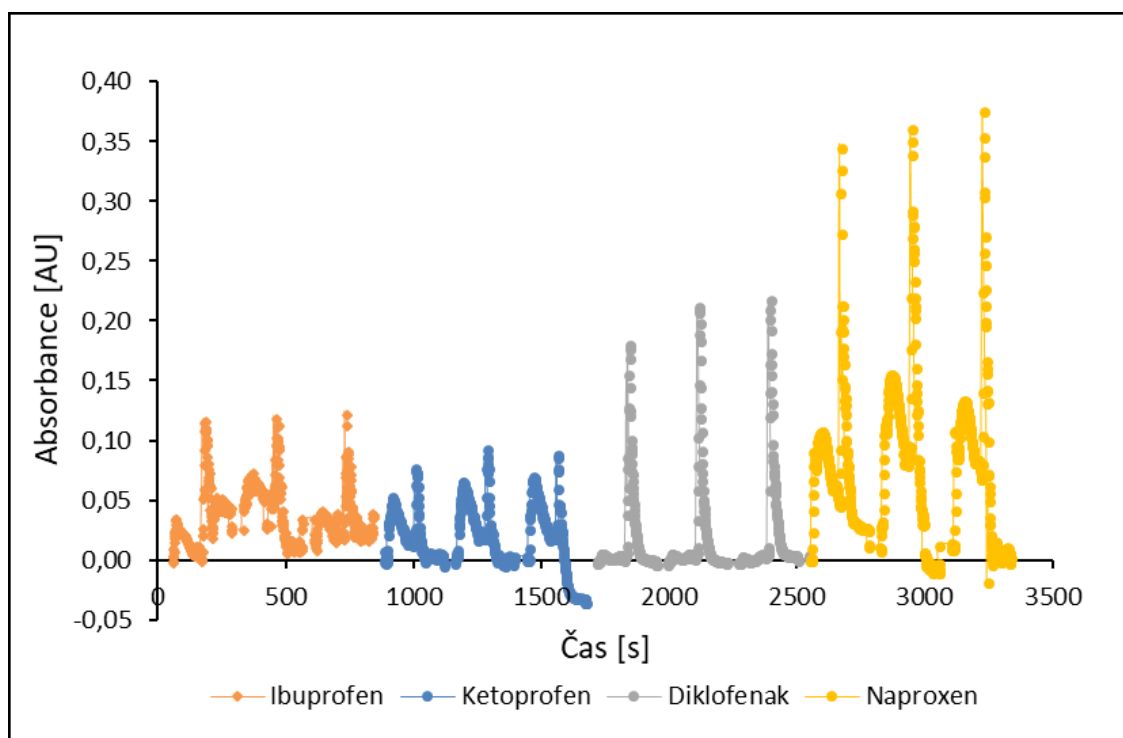
Graf 9: Výsledky měření analytu ranitidin s PVDF nanovláknky

5.3.3. Nesteroidní antiflogistika

Do měřicího cyklu byl vložen mezikrok aspirace pH modifikátoru, jelikož látky, které mají hodnotu pKa kolem 4, by byly při neutrálním pH v disociovaném stavu, což při naší analýze nebylo žádoucí. Jako kyselina byla zvolena kyselina chlorovodíková o koncentraci 10 mmol/l a elučním činidlem 70% methanol ve směsi s hydroxidem sodným o koncentraci 10 mmol/l. Hodnoty vlnových délek byly nastavené dle tabulky 2 na hodnoty absorpčních maxim modelových analytů nesteroidních antiflogistik diklofenaku, ibuprofenu, ketoprofenu a naproxenu.

Proces analýzy se uskutečňoval tak, že po aspiraci nosného proudu nastalo opakování příkazu aspirace vzorku a aspirace kyseliny, který probíhal zpravidla pětkrát. Poté pokračovalo dávkování vzorku, aspirace elučního činidla a měření eluce.

Z výsledků měření se může vyvodit, že téměř kompletní retence bylo dosaženo u látky diklofenak, která má hodnotu pKa 4,15 a logP 4,51. Ostatní látky byly zadrženy jenom částečně, jelikož odhad retence vypočítaný dle vzorce je u ibuprofenu 72%, u ketoprofenu 57%, diklofenak 100% a naproxen 74%.

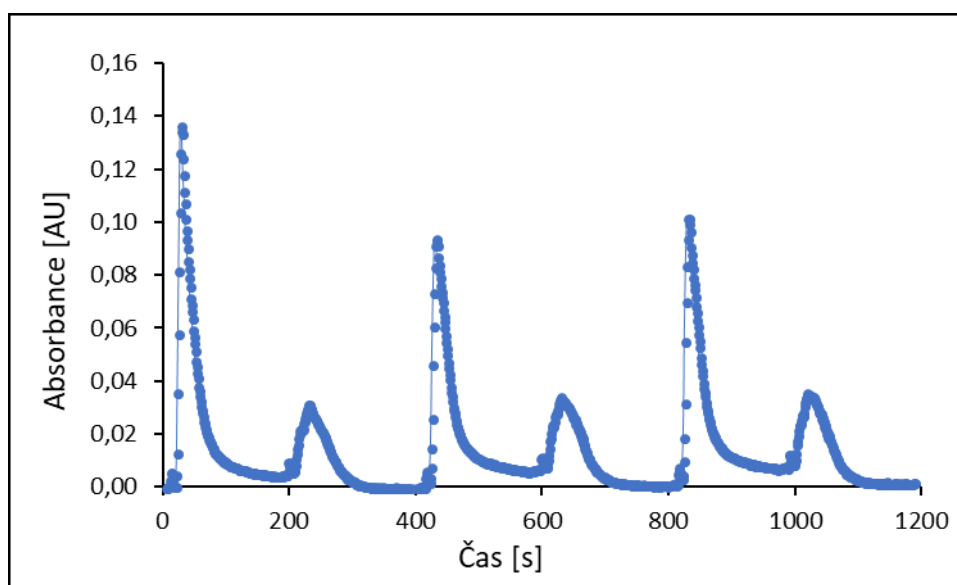


Graf 10: Výsledky měření nesteroidních antiflogistik na nanovláčkách PVDF

5.3.4. Klenbuterol

Podmínky analýzy byly v souladu s údaji v tabulce 3. Kolonka obsahovala PVDF nanovlákná, spektrofotometr byl nastaven na odpovídající vlnovou délku 254 nm a elučním činidlem byl 50% methanol.

Klenbuterol, jehož základem struktury je isoprenalin, nejví v tomto typu měřícího cyklu výraznou afinitu k vláknům PVDF. Vyšší pík je pozorován v dávkovací fázi a průměrná přibližná retence je pouze 23%, což značí slabou retenci na nanovlákněch. Tento problém je pravděpodobně zapříčiněn nízkou hodnotou logP.



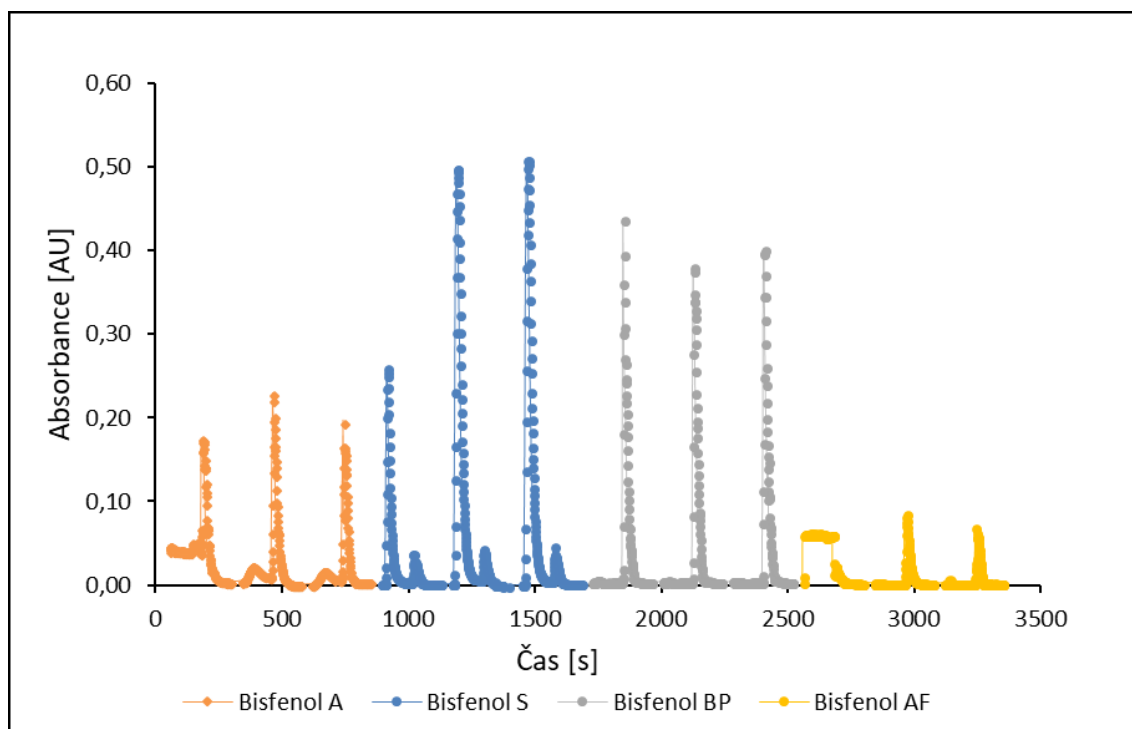
Graf 11: Výsledky měření analytu klenbuterol s PVDF nanovlákně

5.3.5. Bisfenoly

Analýza probíhala s kolonkou naplněnou PVDF vlákny. Spektrofotometr byl nastaven na hodnoty uvedené v tabulce 2 pro bisfenoly. Elučním činidlem byl 70% methanol. Modelovými analyty s koncentrací 10 mg/l ze skupiny bisfenolů byly zvoleny bisfenol A, bisfenol S, bisfenol BP a bisfenol AF.

Podmínky pro průběh analýzy byly stejné jako v kapitole 4.4. Metoda měření.

Bisfenoly patří mezi látky, které jsou neustále sledovány převážně kvůli vlivům na lidské zdraví a životní prostředí, jelikož jsou součástí obalů potravin a nápojů. Z uskutečněné analýzy vyplývá, že docházelo k retenci bisfenolů. U bisfenolu BP proběhla přibližná retence 100%, u bisfenolu A došlo také k úplné retenci. U bisfenolu AF nastala chyba měření, kdy byly aspirovány bublinky a tím byl rušen signál látky. Nejméně se zachytával na PVDF vláknech bisfenol S. Jeho chemické vlastnosti, jako nízká hodnota logP (1,65), nejeví dostatečnou afinitu k použitým nanovláknům. Byla pozorována závislost míry retence na logP – s klesající hodnotou se snižovala míra retence.



Graf 12: Výsledky měření bisfenolů na nanovlákněch PVDF

5.4. Optimalizace SPE metody pro diklofenak

Nejlepší výsledky ve skriningové analýze retence modelových látek na nanovláčkách byly dosaženy pro látku diklofenak na nanovláčkách PVDF, proto byla pro optimalizaci metody extrakce s PVDF nanovláčky zvolena tato látka jako modelový analyt.

- *Výběr pH kyseliny*

Cílem experimentu bylo najít hodnotu pH kyseliny, která se má použít jako pH modifikátor při dávkování diklofenaku na nanovláčka. Roztok diklofenaku byl on-line smísen v mísící cívce s roztokem kyseliny chlorovodíkové. Aspirovalo se 20 μ l diklofenaku o koncentraci 10 mg/l a 5 μ l kyseliny chlorovodíkové. Tento postup se opakoval 5x pro lepší promísení roztoků v systému. Elučním činidlem byl 70% methanol. Byly zkoušeny roztoky HCl o pH 2, 3, 4, 5.

Nejvyšší hodnoty absorpance při eluci byly změřeny při použití pH modifikátoru 3 (viz. tabulka 5), kdy rozdíl mezi λ_{\max} vzorku a slepého pokusu byl 0,014. Při pH 2 byla výška píku slepého pokusu a vzorku totožná, proto byl rozdíl mezi λ_{\max} vzorku a slepého pokusu nulový.

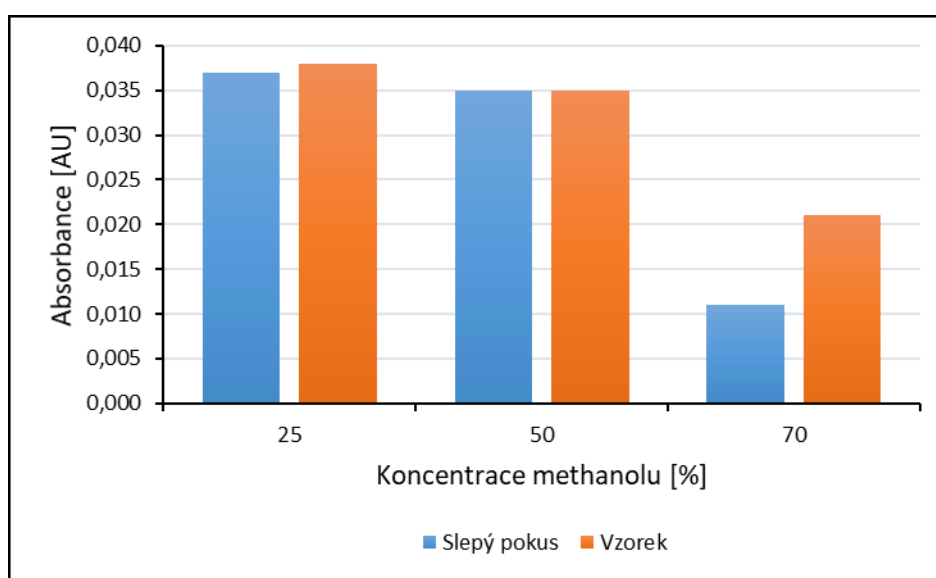
Tabulka 5: Výběr pH kyseliny

pH	Slepý pokus (λ_{\max})	Vzorek (λ_{\max})	Vzorek (λ_{\max}) - slepý pokus (λ_{\max})
2	0,028	0,028	0,000
3	0,011	0,025	0,014
4	0,040	0,050	0,010
5	0,025	0,033	0,008

- *Výběr elučního činidla*

Cílem tohoto pokusu bylo najít vhodnou koncentraci methanolu, používaného jako elučního činidla. Byly zkoušeny koncentrace methanolu 25, 50 a 70%. Jako vzorek byl použit 10 µl diklofenaku o koncentraci 10 mg/l, který byl opět mísen s roztokem kyseliny chlorovodíkové.

Jako jediné eluční činidlo měl 70% methanol vyšší hodnotu absorbance eluční fáze vzorku než slepého pokusu. 25% a 50% koncentrace methanolu měly sice vyšší hodnoty absorbance, ale vykazovaly téměř stejné výšky píků u slepého pokusu a u vzorku. Vhodným doplněním pokusu by bylo zopakovat test s větším objemem vzorku.



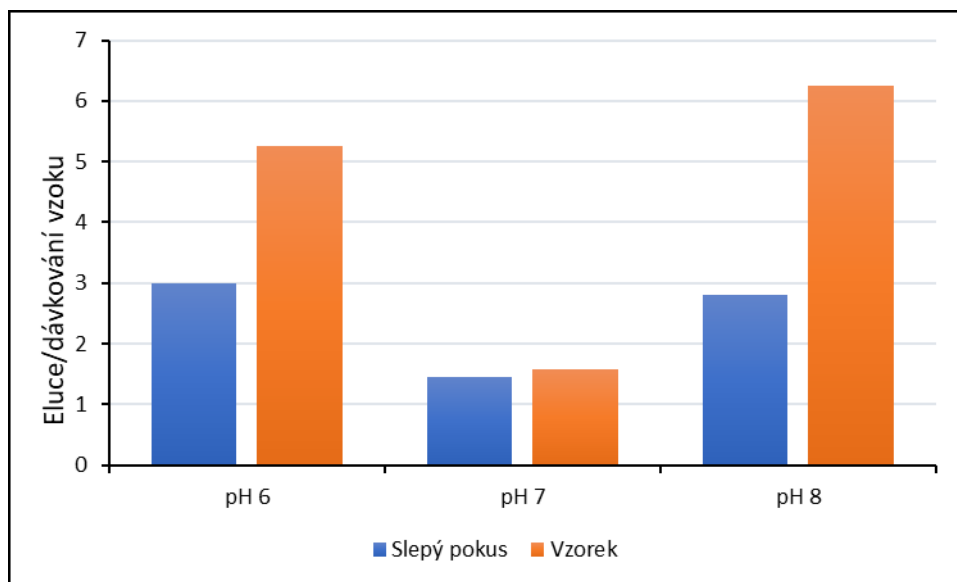
Graf 13: Výběr koncentrace elučního činidla – test retence diklofenaku

- *Výběr pH eluční fáze*

Výběr pH eluční fáze opět souvisí s hodnotou pKa diklofenaku. Analytem byl diklofenak o koncentraci 10 mg/l.

Byly zkoušeny roztoky 70% methanolu s vodnou složkou o pH 6, 7, 8 a 9, připravené přidáváním hydroxidu sodného o koncentraci 2 mmol/l. Při dávkování vzorku i měření byla průtoková rychlost 10 μ l/s.

Výsledky byly vyhodnoceny poměrem výšky elučního píku a výšky píku dávkování vzorku. Optimální výsledky byly pozorovány při pH 8, kdy byly poměry výšek píků vzorku podstatně vyšší než poměry výšek píků slepého vzorku. Měření při pH 9 nebylo možné vyhodnotit kvůli přítomnosti bublinek.

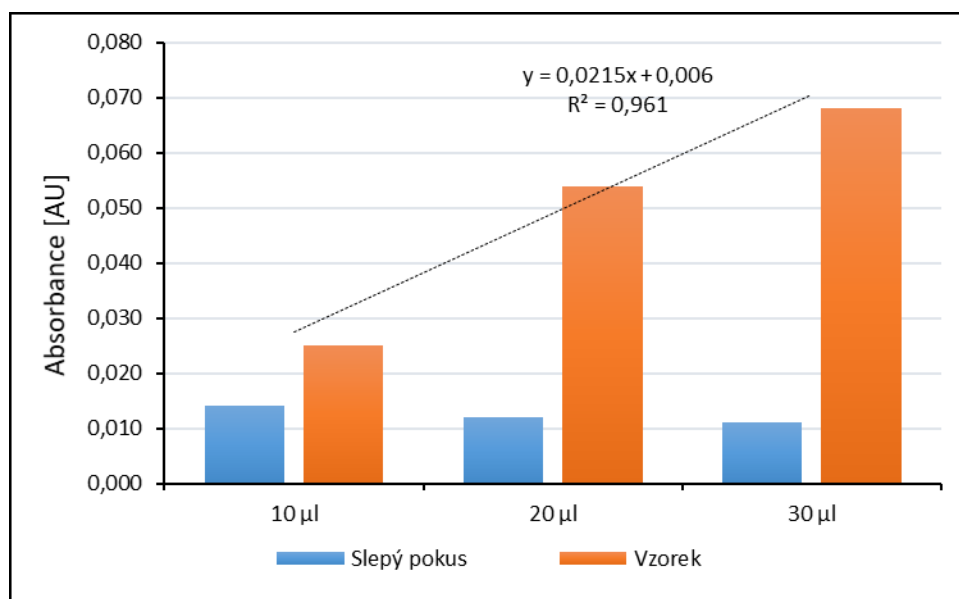


Graf 14: Poměr výšek píků eluce a dávkování slepého vzorku a diklofenaku při různých pH eluční fáze

- *Studium objemu vzorku*

K dané analýze byly vybrány zkoušené vzorky o objemech 10, 20, 30 μl vždy se stejnou koncentrací diklofenaku 10 mg/l. Elučním činidlem byl 70% methanol v kombinaci s roztokem hydroxidu sodného. Dávkování vzorku proběhlo s objemem nosného proudu 700 μl .

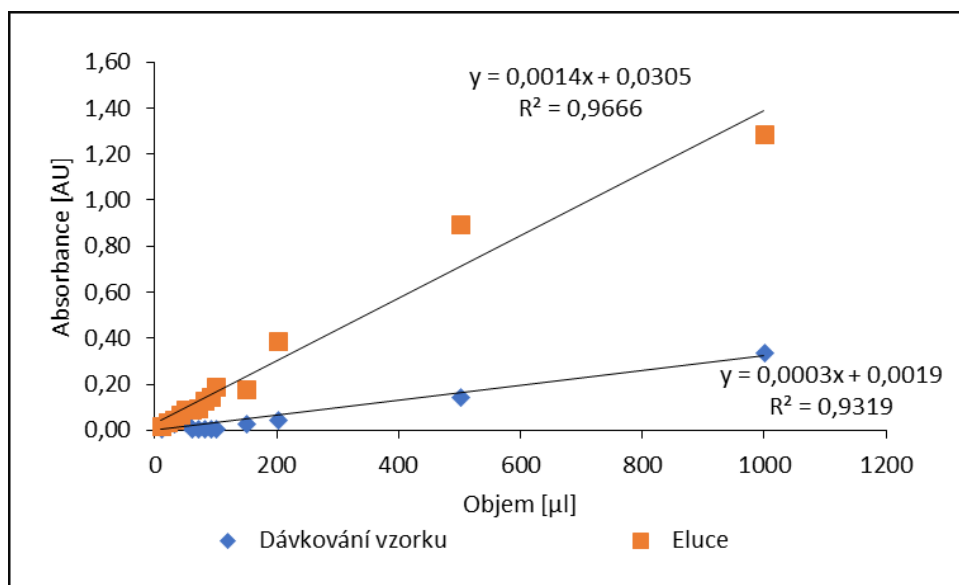
Z výsledků můžeme konstatovat, že výšky píků slepého vzorku zůstávají téměř konstantní a s rostoucím objemem vzorku roste výška elučních píků vzorku.



Graf 15: Výšky elučních píků slepého vzorku a diklofenaku při různých objemech dávkování

- *Kapacita nanovláken*

Cílem dalšího experimentu bylo ověřit kapacitu nanovláken. Byly dávkované objemy vzorku od 10 μl do 1000 μl o koncentraci 10 mg/l. Z výsledků můžeme vyvodit,



Graf 16: Ověření kapacity nanovláken

že závislost výšky elučního píku na objemu vzorku je do objemu 500 μl lineární, při objemu 1000 μl pak dochází ke ztrátě linearity.

V dalším experimentu bylo ověřeno, zda jsou pozorovány stejné výsledky při použití nižšího objemu vzorku s vyšší koncentrací a vyššího objemu vzorku s nižší koncentrací při zachování stejného absolutního množství dávkované látky.

Z výsledků v tabulce 6 je vidět, že nejsou významné rozdíly, jelikož hodnoty výšky elučních píků jsou podobné.

Tabulka 6: Porovnání výšek píků eluce

Hmotnost diklofenaku	Koncentrace	Objem	Výška píku dávkování vzorku	Výška píku eluce
0,5 μg	10 mg/l	50 μl	0,007	0,074
	1 mg/l	500 μl	0,002	0,075

- *Optimální poměr segmentace vzorku*

Segmentace vzorku byla prováděna s cílem zlepšit mísení vzorku a kyseliny v aspiračním kroku. Bylo zkoušeno 200 μl vzorku diklofenaku o koncentraci 10 mg/l bez segmentace a se segmentací, a to tak, že se 5x opakovala smyčka aspirace 40 μl vzorku a 5 μl kyseliny chlorovodíkové (pH 3). To samé bylo prováděno s 500 μl vzorku, kdy následovalo 5x opakování smyčky aspirace 100 μl vzorku a 10 μl kyseliny.

Z výsledků je patrné, že při on-line mísení vzorku s kyselinou nejsou rozdíly při a bez použití segmentace. Nicméně pro zajištění mísení byla v dalších pokusech používána segmentace vzorku s pH modifikátorem.

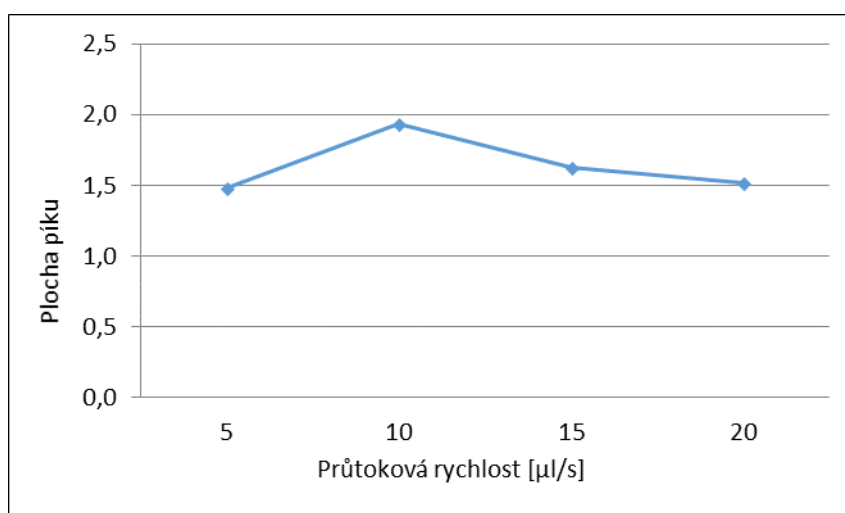
Tabulka 7: Segmentace vzorku

	Hmotnost diklofenaku [μg]	Objem vzorku [μl]	Výška píku dávkování vzorku	Výška píku eluce
Bez segmentace	2	200	0,03	0,35
Segmentace (40-5)	2	200	0,02	0,35
Bez segmentace	5	500	0,01	0,90
Segmentace (100-10)	5	500	0,01	0,86

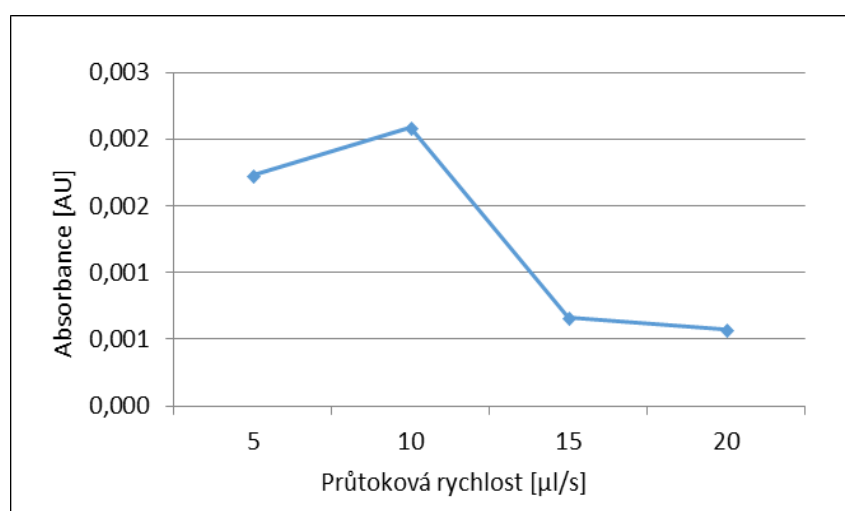
- *Průtoková rychlost dávkování vzorku*

K testování optimální průtokové rychlosti při dávkování vzorku diklofenaku o koncentraci 1 mg/l byly vybrány rychlosti 5, 10, 20 a 20 μl . Opět probíhala segmentace vzorku a kyseliny s objemem 500 μl vzorku. Elučním činidlem byl 70% methanol s roztokem hydroxidu sodného s výsledným pH 8, jehož dávkování probíhalo rychlostí 15 $\mu\text{l/s}$.

Výsledky byly hodnocené pomocí plochy a výšky elučních píků. Optimální výsledky sledujeme při průtokové rychlosti 10 $\mu\text{l/s}$, protože byly získány vyšší hodnoty výšky i plochy píků eluce.



Graf 17: *Optimalizace průtokové rychlosti dávkování vzorku – plocha píku eluce*

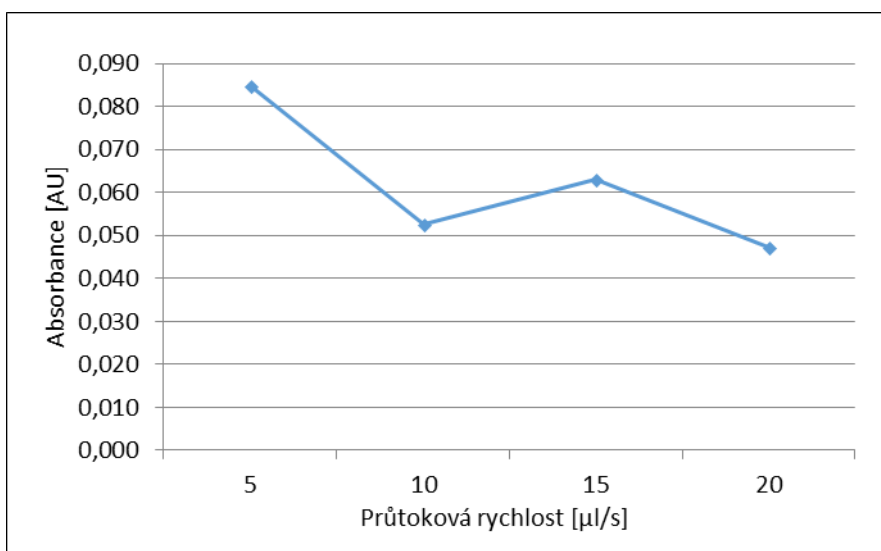


Graf 18: *Optimalizace průtokové rychlosti dávkování vzorku – výška píku eluce*

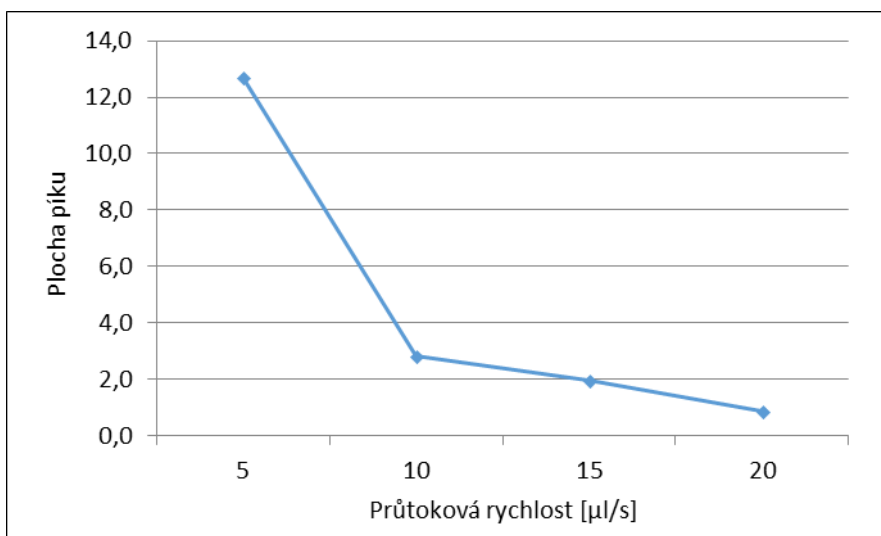
- *Průtoková rychlost eluce*

K testování optimální průtokové rychlosti při eluci vzorku diklofenaku o koncentraci 1 mg/l byly vybrány rychlosti 5, 10, 20 a 20 μl . Průtoková rychlost dávkování vzorku byla zvolena dle předchozí analýzy na 10 $\mu\text{l/s}$. Opět probíhala segmentace vzorku a kyseliny s objemem 500 μl vzorku. Elučním činidlem byl 70% methanol s pH 8.

Při průtokové rychlosti 5 $\mu\text{l/s}$ nastala chyba měření. I když při hodnocení plochy a výšky píku nalézáme rozdílné výsledky, za spolehlivější hodnocení při použití softwaru se považuje hodnocení výšky píku. Na základě toho byla pro další pokusy vybraná průtoková rychlost eluce 15 $\mu\text{l/s}$.



Graf 19: Optimalizace průtokové rychlosti eluce vzorku – výška píku v eluce



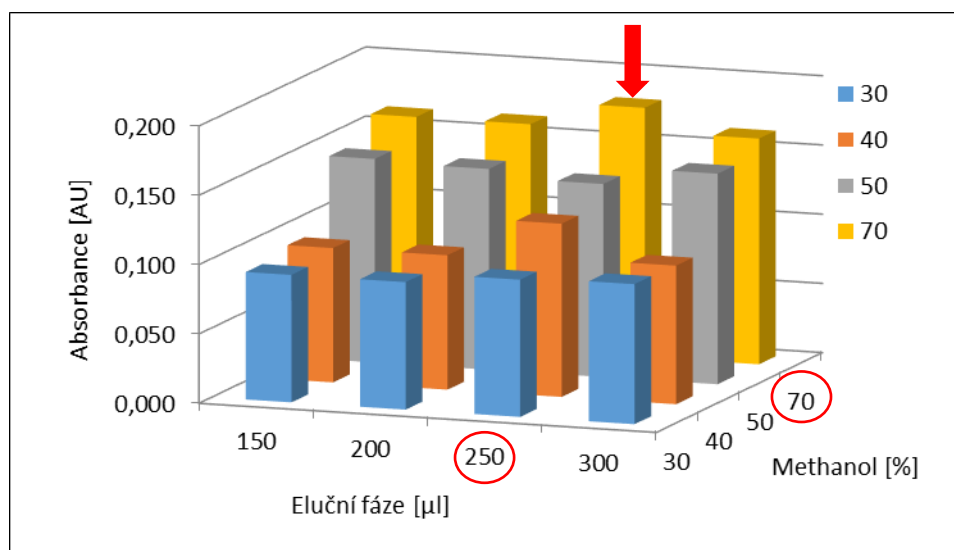
Graf 20: Optimalizace průtokové rychlosti eluce vzorku – plocha píku eluce

- *Výběr objemu eluční fáze*

Cílem tohoto měření bylo zjistit, jestli je možné snížit objem eluční fáze, a tím i spotřebu použitých organických rozpouštědel.

Byly zkoušeny objemy 150, 200, 250 a 300 μl . Následovalo zhodnocení absorbance, kdy bylo možno soudit, že objem eluční fáze je možné snížit na 200 μl , protože i při použití tohoto objemu je pozorována kompletní eluce, tj. píky až po základní linii.

V dalším pokusu byla provedena analýza se dvěma proměnnými najednou – objemem eluční fáze a koncentrací methanolu. Výsledky jsou zobrazeny v grafu 21, ze kterého vyplývá, že se 70% methanolem a objemem 250 μl eluční fáze jsou získány optimální výsledky, tj. nejvyšší výšky elučních píků.



Graf 21: Objem eluční fáze

Z výsledků uvedených v tabulce 8 můžeme říci, že nejvyšší signál je dosažen při použití 70% methanolu jako elučního činidla oproti ostatním koncentracím methanolu. Proto byl jako optimální eluční fáze zvolen 70% methanol s objemem 250 μ l.

Tabulka 8: Optimalizace koncentrace elučního činidla

Koncentrace methanolu	Slepý pokus (λ max)	Vzorek (λ max)
30%	0,010	0,101
40%	0,017	0,100
50%	0,019	0,152
70%	0,020	0,163

- *Finální podmínky*

Tabulka 9: Parametry extrakční metody pro diklofenak

Vzorek diklofenaku	500 μ l se segmentací (100-10), 5 opakování, pH 3
Dávkování vzorku	Průtoková rychlost: 10 μ l/s Objem: 900 μ l
Eluční fáze	70% methanol:30%NaOH pH 8 Průtoková rychlost: 15 μ l/s Objem: 250 μ l
Nanovlákn	PVDF
Vlnová délka	275 nm

- *Kalibrace*

Na základě výsledků předchozích měření byl ke kalibraci zvolen rozsah koncentrací diklofenaku od 0,1 do 20 mg/l. Měření probíhalo podle finálních podmínek uvedených v tabulce 9 a hodnocené byly výšky píku eluce.

Z výsledků uvedených v grafu 22 můžeme vyčíst, že metoda vykazuje dobrou linearitu s korelačním koeficientem 0,9981.

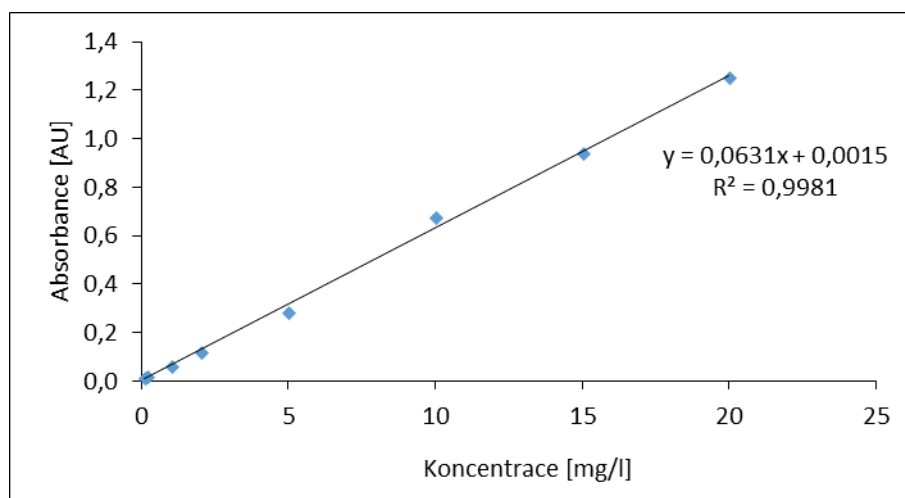
Z kalibrační křivky byly spočítané hodnoty meze detekovatelnosti (limit of detection, LOD) a meze stanovitelnosti (limit of quantitation, LOQ) podle vzorce:

$$LOD = 3 * \frac{STD_{sp}}{a} \quad \text{Rovnice 2}$$

$$LOQ = 3 * LOD \quad \text{Rovnice 3}$$

kde STD_{sp} je směrodatná odchylka slepého pokusu a a je směrnice kalibrační přímky.

Vypočítaná hodnota meze detekce je 0,14 mg/l a meze stanovitelnosti 0,43 mg/l.



Graf 22: Kalibrační křivka diklofenaku

Tabulka 10: Měření kalibrační křivky

Koncentrace [mg/l]	0,1	0,2	1	2	5	10	15	20	Slepý pokus
1. měření	0,015	0,016	0,058	0,110	0,280	0,675	1,030	1,250	0,022
2. měření	0,014	0,020	0,057	0,125	0,270	0,660	0,950		0,024
3. měření	0,017		0,066	0,135	0,308	0,690	0,840	1,260	0,019
Průměr	0,015	0,018	0,060	0,123	0,286	0,675	0,940	1,255	0,022
STD*	0,002	0,003	0,005	0,013	0,020	0,015	0,095	0,007	0,003
RSD* [%]	10,00	15,70	8,20	10,20	6,90	2,20	10,10	0,60	11,60

* STD – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka

6. Shrnutí

V rámci experimentální části bylo vyzkoušeno, že je možné použít nanovlákná v průtokovém systému sekvenční injekční analýzy pomocí kolonky, do které se naplní a která je zapojena do přístroje před detektor. Díky optimalizaci jednotlivých proměnlivých parametrů byla vyvinuta metoda pro měření modelových analytů.

Naše výsledky potvrdily, že je možné použít nanovlákná jako sorbenty pro extrakci tuhou fází, závisí však jak na jejich chemických a fyzikálních vlastnostech, tak na vlastnostech analyzovaných látek.

Prvním analyzovaným typem nanovláken byl PA. Při prvotních analýzách byly optimalizovány počáteční objemy a koncentrace vzorků a jejich průtokové rychlosti. Nejlepší afinitu měla k PA nanovláknům H₂ antihistaminika.

Vysoká retence byla zaznamenána u nanovláken typu PVDF, ke kterým vykazovala afinitu většina testovaných látek. Z lipofilnějších látek měly vysokou retenci skoro všechny analyty ze skupiny bisfenolů, ženské pohlavní hormony – zejména norethisteron, také H₂ antihistaminika vykazovala retenci, ale nebyla zaznamenána dobrá opakovatelnost měření. Navíc PVDF nanovlákná nezpůsobovala v použitém systému zpětný tlak při použitých průtokových rychlostech, je tedy možné říci, že jsou vhodnější pro použití v nízkotlakých průtokových systémech než polyamidová nanovlákná.

Kompletní retence byla zaznamenána u analytu ze skupiny nesteroidních antiflogistik – diklofenaku na nanovlákněch typu PVDF. Tento analyt byl dále zvolen jako modelová látka pro optimalizaci extrakční metody na nanovlákněch. Optimalizované parametry byly použité na změření kalibrační křivky s lineárním rozsahem 0,43 – 20,00 mg/l.

7. Závěr

Bylo úspěšně provedeno testování polyamidových a polyvinylidenfluoridových nanovláken jako sorbentů pro extrakci tuhou fází. Byl použit průtokový systém sekvenční injekční analýzy s polymethylmetakrylátovou kolonkou, která byla naplněna vždy jedním druhem testovaných nanovláken.

S použitými modelovými látkami byla pozorována minimálně částečná retence na obou typech nanovláken. Z toho vyplývá, že testovaná nanovlákná mají potenciál jako nové sorbenty pro extrakci tuhou fází v sekvenční injekční analýze. Byla vyvinuta metoda, která umožňuje skrínig extrakčních vlastností jednotlivých typů nanovláken v průtokovém systému. Tato metoda byla dále optimalizovaná pro extrakci nesteroidního antiflogistika diklofenaku.

8. Literatura

[1] Paseková, H., Polášek, M., Solich, P. *Sekvenční injekční analýza*. Chemické listy 93 (1999) 354-359.

[2] Sklenářová, H. *Automatizace a průtokové analytické techniky* [online]. Moodle pro výuku 1. [cit 2018-01-29]. Dostupné z:
https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/281850/mod_resource/content/1/SIA%20%281%29.pdf

[3] Růžička, J. *Flow injection*. 4th Edition, FIALab Instruments Inc., 2009.

[4] Sklenářová, H. *Sekvenční injekční analýza* [online]. Moodle pro výuku 1, UK. [cit 2018-01-29]. Dostupné z:
https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/280586/mod_resource/content/1/SIA-teorie%20k%20praktick%C3%BDm%20cvi%C4%8Den%C3%ADm.pdf

[5] Mráková, V. *Vliv průtokové rychlosti na průběh a možnosti vyhodnocení různých reakcí v SIA systému*. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Hana Sklenářová.

[6] Sklenářová, H. *Automatizace a průtokové analytické techniky* [online]. Moodle pro výuku 1. [cit 2018-02-24]. Dostupné z:
https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/281850/mod_resource/content/1/SIA%20%281%29.pdf

[7] FIA Products [online]. [cit 2018-03-21]. Dostupné z:
<http://www.flowinjection.com/images/ProductFiles/ProductBrochures/FIALab-Product-Catalog.pdf>

[8] Flow Injection Analysis for Environmental Assays [online]. [cit 2018-03-21]. Dostupné z:
http://www.flowinjection.com/images/ApplicationFiles/Applications_2017/Environmental-Applications.pdf

[9] Applications – FlowInjection.com. Home – FlowInjection.com [online]. [cit 2018-03-21]. Dostupné z: <http://www.flowinjection.com/applications>

[10] Universities/Research & Development [online]. [cit 2018-03-21]. Dostupné z: <http://www.flowinjection.com/images/UniversitiesResearchDevelopment3.pdf>

- [11] Nováková, L., Douša, M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vydání. Praha: Lucie Nováková, Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0
- [12] Skoog, Douglas A. *Skoog and West's fundamentals of analytical chemistry*. 9. edice. Andover: Cengage Learning, 2014. Cengage technology edition. ISBN 978-1-4080-9373-3.
- [13] Tissue, Brian M. *Basics of analytical chemistry and chemical equilibria*. Hoboken: Wiley, 2013. ISBN 978-0-470-59208-3.
- [14] Borkovcová, I., Kostřounová, R. *Extrakční metody pro stanovení hydrofilních látek* [online]. [cit 2018-03-21]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a--navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/ls-2013-2014/h3cp2/index/h3cp2-studijni-material---stanoveni-hydrofilnich-latek-ls-13-14.pdf>.
- [15] Riddellová, K. *Extrakce (SPE KOLONKY)* [online prezentace]. 2012. [cit 2018-03-21]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-6%20LSC_SPE_2012.pdf.
- [16] Augusto, F., Hantao, L. W., Mogollón, N. G., Braga, S. C. *New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry 43 (2013) 14-23.
- [17] Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., Namieśnik, J. *Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media*. TrAC Trends in Analytical Chemistry 77 (2016) 23-43.
- [18] Poole, C. F. *New trends in solid-phase extraction*. TrAC Trends in analytical chemistry 22.6 (2003) 362-373.
- [19] Wikipedie: Otevřená encyklopedie: *Nanovlákn* [online]. c2017 [cit. 2018-02-02]. Dostupný z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Nanovl%C3%A1kno&oldid=15404206>.
- [20] Wikipedia, The Free Encyclopedia. *Nanofiber* [online]. c2018 [cit. 2018-02-02]. Dostupný z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Nanofiber&oldid=822511836>
- [21] Petráš, D., Kimmer, D., Soukup, K., Klusoň, P. *Bezpečná nanovlákn*. Chemické listy 103 (2009) 1009-1016.

- [22] Švachová, V. *Zvláknování celulózy pomocí elektrospinningu a plazmochemické modifikace celulóзовých nanovláken*. Brno, 2012. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Milan Alberti. [cit 2018-01-25]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/270274/prif_m/Diplomova_prace-_final_verze_pdf.pdf
- [23] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Lim, T., Ma, Z. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Hackensack, NJ: World Scientific, 2005. s. 1-18. ISBN 981-256-454-3.
- [24] Kuželová Košťálová, E. *Textilní nanomateriály* [online prezentace]. 2015 [cit 2018-01-31]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/689/course/section/1113/Prezentace1_2015_uvod%20NA%20WEB.pdf
- [25] Kuželová Košťálová, E. *Parametry ovlivňující proces elektrostatického zvláknování* [online prezentace]. 2015 [cit 2018-01-31]. Dostupné z: <https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/689/course/section/1112/Prezentace%202%20%28parametry%20zvlaknovaciho%20procesu%29.pdf>
- [26] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W. E., Yong, T., Ma, Z., Ramaseshan, R. *Electrospun nanofibers: solving global issues*. *Materials today* 9.3 (2006) 40-50.
- [27] Haider, A., Haider, S., Kang, I. *A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology*. *Arabian Journal of Chemistry* (2015).
- [28] Reyes-Gallardo, E. M., Lucena, R., Cárdenas, S. *Electrospun nanofibers as sorptive phases in microextraction*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 84 (2016) 3-11.
- [29] Háková, M., Raabová, H., Chocholoušová Havlíková, L., Chocholouš, P., Chvojka, J., Šatínský, D. *Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent*. *Talanta* 181 (2018) 326-332.
- [30] Ducháček, V. *Polymery. Výroba, vlastnosti, zpracování, použití* [online]. Praha, 2006. [cit 2018-04-03]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-617-6/pages-img/001.html.

- [31] PA Polymerové typy – Resinex. Resinex – Distribuce plastů a kaučuků [online]. [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <http://www.resinex.cz/polymerove-typy/pa.html>.
- [32] PVDF Polymerové typy – Resinex. Resinex - Distribuce plastů a kaučuků [online]. [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <http://www.resinex.cz/polymerove-typy/pvdf.html>.
- [33] Al-Gharabli, S., Kujawa, J., Mavukkandy, M. O., Arafat, H. A. *Functional groups docking on PVDF membranes: Novel Piranha approach*. European Polymer Journal 96 (2017) 414-428.
- [34] Cui, Z., Li, X., Zhang, Y., Wang, Z., Gugliuzza, A., Militano, F., Drioli, E., Macedonio, F. *Testing of three different PVDF membranes in membrane assisted-crystallization process: Influence of membrane structural-properties on process performance*. Desalination (2017).
- [35] Háková, M., Havlíková Chocholoušová, L., Chvojka, J., Solich, P., Šatínský, D. *An on-line coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography—A case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples*. Talanta 178 (2018) 141-146.
- [36] Lüllmann, H., Mohr, K., Hein L. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 3., české. Ilustroval Wirth, J. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [37] Lüllmann, H. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing, 2002. ISBN 9788071699767.
- [38] Doležal, M., Opletalová V., Miletín, M., Zimčík, P., Kučerová, M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1633-9.
- [39] European chemical profile: Bisphenol A. Chemical Industry News & Chemical Market Intelligence ICIS.com [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: <https://www.icis.com/resources/news/2011/05/09/9457899/european-chemical-profile-bisphenol-a/>.
- [40] Bisphenol A. The PubChem Project [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol_A#section=Top.
- [41] Bisphenol. European Food Safety Authority [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>.

[42] About Bisphenol A. Bisphenol-A Website [online]. [cit. 2018-03-27].

Dostupné z: <http://www.bisphenol-a.org/about/bpa-info/bpa-synthesis.html>.

[43] Pivnenko, K., Pedersen, G. A., Eriksson, E., Astrup, T. F. *Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper*. *Waste management*, 44 (2015) 39-47.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma sekvenční injekční analýzy (SIA) [3]	12
Obrázek 2: Proces elektrostatického zvlákňování	19
Obrázek 3: Struktury modelových analytů ze skupiny NSAID	24
Obrázek 4: Struktury ženských pohlavních hormonů	25
Obrázek 5: Struktury modelových analytů ze skupiny H ₂ antihistaminik	26
Obrázek 6: Struktura clenbuterolu	27
Obrázek 7: Struktura vybraných bisfenolů	28
Obrázek 8: Schéma použitého systému SIA s kolonkou s nanovláknem	29
Obrázek 9: Kolonka z polymethylmetakrylátu naplněná nanovláknem	33

Seznam tabulek

Tabulka 1: Typy nanovláken	30
Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti modelových látek	31
Tabulka 3: Základní příkazy a vysvětlení použité v analýze	34
Tabulka 4: Průtoková rychlost dávkování vzorku 10 μ l/s a 5 μ l/s při různých objemech	36
Tabulka 5: Výběr pH kyseliny	46
Tabulka 6: Porovnání výšek píků eluce	50
Tabulka 7: Segmentace vzorku	50
Tabulka 8: Optimalizace koncentrace elučního činidla	54
Tabulka 9: Parametry extrakční metody pro diklofenak	54
Tabulka 10: Měření kalibrační křivky	56

Seznam grafů

Graf 1: Optimalizace dávkování objemu vzorku desogestrelu	36
Graf 2: Výsledky měření norgestrelu na PA nanovlákních	37
Graf 3: Analýza norgestrelu o různých koncentracích vzorku	38
Graf 4: Výsledky měření analytu klenbuterol s PA nanovlákní	39
Graf 5: Výsledky měření cimetidinu na PA nanovlákních	40
Graf 6: Výsledky měření ranitidinu na PA nanovlákních	40
Graf 7: Výsledky měření analytů ženských pohlavních hormonů.....	41
Graf 8: Výsledky měření analytu cimetidin s PVDF nanovlákní	42
Graf 9: Výsledky měření analytu ranitidin s PVDF nanovlákní.....	42
Graf 10: Výsledky měření nesteroidních antiflogistik na nanovlákních PVDF	43
Graf 11: Výsledky měření analytu klenbuterol s PVDF nanovlákní	44
Graf 12: Výsledky měření bisfenolů na nanovlákních PVDF	45
Graf 13: Výběr koncentrace elučního činidla – test retence diklofenaku.....	47
Graf 14: Poměr výšek píků eluce a dávkování slepého vzorku a diklofenaku při různých pH eluční fáze	48
Graf 15: Výšky elučních píků slepého vzorku a diklofenaku při různých objemech dávkování	49
Graf 16: Ověření kapacity nanovláken	49
Graf 17: Optimalizace průtokové rychlosti dávkování vzorku – plocha píku eluce	51
Graf 18: Optimalizace průtokové rychlosti dávkování vzorku – výška píku eluce.....	51
Graf 19: Optimalizace průtokové rychlosti eluce vzorku – výška píku v eluce	52
Graf 20: Optimalizace průtokové rychlosti eluce vzorku – plocha píku eluce.....	52
Graf 21: Objem eluční fáze.....	53
Graf 22: Kalibrační křivka diklofenaku	55